

Bestimmung der Parameter K_m und v_{max} der Michaelis-Menten-Kinetik auf Basis der Versuchsplanung

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

zur Erlangung des Grades
DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

-Dr. rer. nat.-

genehmigte
DISSERTATION

von

Dipl.-Chem. Ali Yildirim

geboren am 14. Januar 1972
in Arguvan / Türkei

2010

Referent

Prof. Dr. T. Scheper

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Korreferent

Prof.Dr. B. Hitzmann

Institut für Technische Chemie

Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Tag der Promotion: 10.09.2010

Hierdurch erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Masterarbeit, Diplomarbeit oder andere Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, September 2010

Ali Yildirim

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 2004 bis November 2009 am Institut für Technische Chemie der Leibniz Universität Hannover unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. **Thomas Scheper** angefertigt, dem ich für die mir gebotenen Arbeitsmöglichkeiten und Unterstützung dieser Arbeit danke.

Für die Übernahme des Korreferats danke ich Herrn Prof. Dr. **Bernd Hitzmann**.

Herrn Prof. Dr. **H. Meyer** danke ich besonders für die Diskussionen zu dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt meinen Mitarbeitern und Freunden für ihre ständige Unterstützung und immer währende Hilfe: Dipl. Chem. Ing. A. Aydemir

Herzlichen Dank auch an Martina Weiss und ihre erstaunliche Kenntnis bezüglich aller sich im Institut befindlichen Geräte, die sie immer wieder freundlich an Unwissende wie mich weitergab.

Insbesondere folgenden Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie bin ich Dank schuldig. Ihre Beiträge und Informationen in Diskussionen und Gesprächen haben mir bei der Lösung der Aufgabenstellung sehr geholfen.

Dr. Frank Stahl

Dr. Patrick Lindner

Dr. Ivo Havlik

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Technische Chemie für die sehr gute Arbeitsatmosphäre.

Ich danke meiner Familie, Freunden und Bekannten für ihre Unterstützung und Begleitung.

Zusammenfassung

Um aktive Substanzen zu finden und intrazelluläre Handlungsweisen zu verstehen wird die Untersuchung von Enzymkinetik zunehmend wichtiger. Sie geben eine wesentliche Auskunft darüber, wie sich ein Enzym verhalten oder in gegebenen Situationen antworten wird.

Methoden, um K_m und v_{max} der Michaelis-Menten-Gleichung zu bestimmen, sind für die moderne Biologie sehr wichtig. Um die Bestimmungsmethoden für K_m und v_{max} zu verbessern und mathematisch weiterzuentwickeln hat es unterschiedliche Ansätze bzw. Anstrengungen gegeben

Das Hauptziel dieses Projektes war den Parametereinschätzungsfehler des Michaelis–Menten-Enzymskinetischer Prozesses genauer zu untersuchen und um analytisch das Suchgebiet von kinetischen Parametern zu reduzieren, sowie numerisch das Optimum für Parameter zu spezifizieren.

Durch die experimentelle Überprüfung wird die Veresterung von Isopropylidenglycerin (IPG) mit Vinylacetat durch *Pseudomonas cepacia* in Hexan und die Umsetzung von 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) durch Pilzen isolierter *Tyrosinase* in das gefärbte Dopachrom untersucht, als auch die Michaelis-Menten-Konstante K_m und v_{max} mittels „die Methode der kleinsten Fehlerquadrate im Puls-System“ berechnet.

In dieser Arbeit wird auch der Einfluss von Temperatur und Enzymkonzentration auf der Veresterung von Isopropylidenglycerin (IPG) mit Vinylacetat erforscht, wie der Produktenantiomerenüberschuss gesteigert werden kann.

Schlagworte: Enzymkinetik, Parametereinschätzungsfehler, Parametern

Abstract

The researches in enzyme kinetics become more important for the investigation of active compounds and understanding of the intracellular activities. As a result of these researches, it is possible to get information about how enzyme behaves or reacts for the different situations.

The modern biology is very important to define the K_m and v_{max} parameters of Michaelis-Menten equation. There are different mathematical approaches to improve the methods for the determination of K_m and V_{max} values.

The aim of this work is to determine the parameter estimation error of the Michaelis – Menten kinetics constants. This error is studied analytically to reduce the search area as well as numerically to specify the optimum for parameter estimation.

For the calculation of K_m and v_{max} by the Least Square method in pulse system, two different reactions have been experimentally considered. The first one is the esterification of isopropylideneglycerin (IPG) with vinylacetate by the catalysis of *Pseudomonas cepacia* in hexane, and the other one is the reaction of 3,4-Dihydroxyphenylalanine (DOPA) by mushrooms of isolated *Tyrosinase* in the coloured Dopachrom.

In this work, the effect of temperature and enzyme concentration on the reaction conditions esterification of isopropylideneglycerin (IPG), catalyzed by *Burkholderia cepacia* lipase (BCL), previously known as *Pseudomonas cepacia*, has been studied to improve how the enantiomeric ratio can be increased.

Keywords: enzyme kinetics, parameter estimation error, parameters

Inhaltsverzeichnis

	Abbildungsverzeichnis.....	X
	Tabellenverzeichnis.....	XII
	Abkürzungsverzeichnis.....	XIII
1	Einleitung.....	1
2	Zielsetzung.....	4
2.1	Der Einfluss von Temperatur und Enzymkonzentration auf der enzymatischen Reaktion	4
2.2	Die Bestimmung Parameter K_m und v_{max} der M.-M.-Kinetik	7
3	Theoretischer Grundlagen.....	9
3.1	Michaelis-Menten-Gleichungen	9
3.2	Integrierte Michaelis-Menten-Gleichung	14
3.3	Die Methode der kleinsten Quadrate	15
3.4	Enantioselektivität	16
3.5	Die Fischer-Informationsmatrix für Enzymkinetik	17
3.6	Lipasen	21
3.6.1	<i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	24
3.6.2	<i>Tyrosinase</i>	26
4	Material und Methoden.....	28
4.1	Die Veresterung von IPG mit Vinylacetat in Hexan	28
4.1.1	Reaktionsanlage für Hexanexperimente von IPG	28
4.1.2	Probenahme von Hexanexperimenten	29
4.2	Die Oxidation von L-Dopa zu Dopachrom durch <i>Tyrosinase</i>	29
4.2.1	Reaktionsanlage für die Umsetzung von L-Dopa zu Dopachrom	29
4.3	Chromatographie	31
4.3.1	Gaschromatographie	31
4.4	Spektralphotometrie	33

5.	Experimenteller Teil	35
5.1	Experimente zur Veresterung von IPG mit Vinylacetat	35
5.1	Kalibrationsgerade für Gaschromatographie	35
5.2	Charakterisierung der Enzymatischen IPG-Umsetzung	36
5.2.1	Einfluss der Temperatur auf die Enantioselektivität von <i>B.Cepacia Lipase</i>	36
5.2.1.1	Esterifizierung des Isopropyliden-Glycerins bei unterschiedlichen Temperaturen	40
5.2.2	Einfluss der Lipasekonzentration auf die enzymatischen Reaktionen	43
5.2.2.1	Umsatz (U) und Selektivität bei 35 ° C	43
5.2.2.2	Umsatz (U) und Selektivität bei 50 ° C	45
5.2.3	Veresterung von L-und D-IPG	48
5.2.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Umesterung von IPG.	50
5.3	Vergleich vom Batch- und Fed-Batch-Prozess	51
5.3.1	Veresterung von D-IPG im Batch Prozess	51
5.3.1.1	Berechnung von v_{max} und K_m im Batch-Prozess durch integrierte M.-M.-Gleichung.	51
5.3.1.2	Berechnung von v_{max} und K_m im Batch-Prozess durch kleinste Fehlerquadrate	52
5.3.2	Veresterung von D-IPG im Fed Batch Prozess	53
5.3.2.1	Berechnungen von v_{max} und K_m im Fed-Batch-Prozess durch kleinste Fehlerquadrate.	54
5.3.3	Zusammenfassung Vergleich von Batch-und Fed-Batch-Prozess	56
5.4	Untersuchungen den Parametereinschätzungsfehlers des Michaelis–Menten-Enzym kinetischen Prozesses im Fed-Batch-Prozess	57
5.4.1	Berechnung von v_{max} und K_m von D-IPG im Fed Batch Prozess	57
5.4.2	II. Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess	58
5.4.2.1	II. Puls Experiment I. Versuch	59
5.4.2.2	II. Puls Experiment II. Versuch	60
5.4.3	III. Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess	63
5.4.4	IV. Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess	65
5.4.5	Zusammenfassung Parametereinschätzungsfehler des Michaelis–Menten Enzymkinetischen Prozesses	68

5.5	Die Oxidation von L-DOPA durch aus Pilzen isolierter <i>Tyrosinase</i> in das gefärbte Dopachrom.	69
5.5.1	Kalibrationsgerade zur Berechnung der Dopachrom-Konzentration	70
5.5.2	Optimierung vom L-DOPA Experiment	71
5.5.2.1	Einfluss der Enzymkonzentration auf die enzymatische Reaktion	72
5.5.2.2	Einfluss der Enzymkonzentration auf die enzymatische Reaktion	73
5.5.2.3	Temperatureinfluss auf die Reaktion	76
5.5.3	Die Oxidation von L-DOPA im Batch Prozess	77
5.5.3.1	I. Experiment zur Oxidation von L-DOPA im Batch Prozess	77
5.5.3.2	II. Experiment zur Oxidation von L-DOPA im Batch Prozess	79
5.5.4	Die Oxidation von L-DOPA im Fed Batch Prozess	81
5.5.4.1	I Puls Experimente	81
5.5.4.2	II. Puls Experiment zur Oxidation von L-DOPA	83
5.5.5	Zusammenfassung zur Oxidation von L-DOPA im Fed-Batch-Prozess	86
6.	Literaturverzeichnis.....	87
7.	Anhang.....	94
7.1	Gaschromatographien	94
7.1.1	Geräteeinstellungen	94
7.1.2	Retentionszeiten	94
7.2	Chemikalien	95
7.3	Geräte bei der Probe Aufarbeitung	95
7.4	Fehlerbetrachtungen	95
7.4.1	Fehlerbestimmung von benutzten Pipetten	96
7.4.2	Fehler Bestimmung von Gaschromatographie	97
7.5	Einheiten der Enzymaktivität	98
8.	Lebenslauf	99

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Reaktion von Isopropylidenglycerin mit Vinylacetat.	4
Abb. 2	Raper–Mason-Lerner Reaktions-Mechanismen.	7
Abb. 3	Energie und Reaktionskoordinatendiagramm.	9
Abb. 4	Zeitliche Veränderung der Reaktionspartner einer enzymkatalysierten Reaktion.	10
Abb. 5	Auftragung der integrierte Michaelis-Menten-Gleichung.	14
Abb. 6	α/β -Hydrolasefaltung von Lipasen.	21
Abb. 7	Berechnete Oberfläche des Alkohols verbindliche Seite von <i>Burkholderia cepacia</i> (<i>Pseudomonas cepacia</i>).	25
Abb. 8	Umfassende Struktur von <i>Tyrosinase</i> .	27
Abb. 9	Reaktionsanlage für das Hexan-Experiment.	28
Abb. 10	Reaktionsanlage für das L-DOPA Puls - Experiment.	30
Abb. 11	Hauptbestandteile eines gaschromatographischen Systems.	31
Abb. 12	Die Matrix-Programmierung in der Gaschromatographie.	32
Abb. 13	Hauptbestandteile eines spektralphotometrischen Systems.	34
Abb. 14	Kalibrationsgerade von 50-750 mmol/L D-IPG.	35
Abb. 15	Kalibrationsgerade von 5-100 mmol/L D-IPG.	36
Abb. 16	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von IPG bei verschiedenen Temperaturen.	40
Abb. 17	Zeitlicher Verlauf des (eeS) von IPG bei verschiedenen Temperaturen.	41
Abb. 18	Zeitlicher Verlauf des (eeP) von IPG bei verschiedenen Temperaturen.	41
Abb. 19	Zeitlicher Verlauf der Enantioselektivitäten bei verschiedenen Temperaturen.	42
Abb. 20	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 35°C.	43
Abb. 21	Zeitlicher Verlauf des (eeS) von IPG mit verschidenen Lipasemengen bei 35 °C.	44
Abb. 22	Zeitlicher Verlauf des Enantiomerenüberschusses (eeP) von IPG bei 35 °C.	44
Abb. 23	Zeitlicher Verlauf der Enatioselektivitäten mit verschiedenen Lipasemengen bei 35°C.	45
Abb. 24	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 50 °C.	45
Abb. 25	Zeitlicher Verlauf des eeS von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 50 °C.	46
Abb. 26	Zeitlicher Verlauf des eeP von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 50 °C.	46
Abb. 27	Zeitlicher Verlauf der Enatioselektivitäten mit verschiedenen Temperaturen bei 50°C.	47
Abb. 28	Zeitlicher Konzentrationsverlauf von D-und L-IPG mit 50 mg Lipase bei 50 °C.	48
Abb. 29	Zeitlicher Umsatzverlauf von D-und L-IPG mit 50 mg Lipase bei 50 °C.	48
Abb. 30	Zeitlicher Verlauf der Konzentration von D-IPG mit 50 mg Lipase bei 50 °C.	51
Abb. 31	Zeitlich idealer Verlauf der Konzentration von D-IPG mit 50 mg Lipase bei 50 °C.	52
Abb. 32	3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Batch Prozess.	52
Abb. 33	Zeitlicher Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens beim Puls-Experiment.	53
Abb. 34	Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom D-IPG beim Fed-Batch-Prozess (Puls-Experiment).	54
Abb. 35	3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Fed-Batch Prozess.	54
Abb. 36	Gütefunktionale in der Umgebung des Minimums (berechnete optimale Parameter).	55
Abb. 37	Rechnungsablauf von Fed-Bactch Prozess.	57

Abb.38	Zeitlicher Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens vom D-IPG.	58
Abb.39	Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom D-IPG beim Fed-Batch-Prozess (Puls-Experiment).	59
Abb. 40	3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Fed-Batch Prozess II. Puls I. Versuch.	60
Abb.41	Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom D-IPG beim Fed-Batch-Prozess II. Puls II. Versuch.	60
Abb. 42	3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Fed-Batch Prozess II. Puls II. Versuch.	61
Abb. 43	3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Fed-Batch Prozess II. Puls II. verschuch.	62
Abb.44	Durch Matlab berechnete ideale Reaktionbedingungen für das III. Puls Experiment von D-IPG.	63
Abb. 45	3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Fed-Batch Prozess im III. Versuch.	64
Abb. 46	3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Fed-Batch Prozess.	64
Abb. 47	Durch Matlab berechnete ideale Reaktionbednigungen für das IV. Puls Experiment von D-IPG.	65
Abb.48	Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom D-IPG beim Fed-Batch-Prozess IV. Puls Experiment.	66
Abb. 49	Die Oxidation von L-Dopa zu dopachrom.	69
Abb. 50	Kalibrationsgerade von Dopachrom.	70
Abb. 51	Schematische Zeichnung der Umlaufapparatur von L-DOPA.	71
Abb. 52	Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von L-DOPA in Dopachrom bei 25 °C und verschiedenen L-DOPA-Konzentrationen.	72
Abb. 53	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von verschiedenen L-DOPA-Konzentrationen.	73
Abb. 54	Bestimmung der optimalen Enzykonzentration bei der Umsetzung von L-DOPA..	73
Abb. 55	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.	74
Abb. 56	Zeitlicher Verlauf der Konzentrationen von L-DOPA mit verschiedenen Lipasemengen bei 25°C.	74
Abb. 57	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.	75
Abb. 58	Zeitlicher Verlauf der Konzentration von IPG bei verschiedenen Temperaturen.	76
Abb. 59	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei verschiedenen Temperaturen.	76
Abb. 60	Zeitlicher Verlauf der Konzentration von L-DOPA bei 25 °C.	77
Abb. 61	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei 25 °C.	78
Abb. 62	Auftragung der integrierten M.-M.-Gleichung von L-DOPA bei 25 °C.	78
Abb. 63	Zeitlicher Verlauf der Konzentration von L-DOPA bei 25 °C.	79
Abb. 64	Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei 25°C.	80
Abb. 65	v_{max} und K_m Werte von 10,1425 mmol/l L-DOPA bei 25°C.	80
Abb. 66	Durch Matlab berechnete ideale Reaktionbednigungen für I. Puls Experiment von L-DOPA	81
Abb.67	Zeitlicher Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens vom L-DOPA I. Puls Exp.	82
Abb.68	Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom L-DOPA beim Fed-Batch-Prozess I. Puls Experiment.	82
Abb. 69	Durch Matlab berechnete ideale Reaktionbednigungen für das II. Puls Experiment von L-DOPA.	83

Abb.70	Zeitlicher Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens vom L-DOPA II. Puls Exp.	83
Abb. 71	Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom L-DOPA beim Fed-Batch-Prozess II. Puls Experiment.	84
Abb. 72	Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen vom L-DOPA im Fed-Batch Prozess II. Versuch.	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Klassifizierung kommerziell erhältlicher Lipasen nach Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz.	23
Tabelle 2	YASUNOBU unterscheidet nach Vorkommen und Eigenschaften vier verschiedene Tyrosinase-Enzyme.	26
Tabelle 3	Forschung über die Änderung der Enantioselektivität Temperatur	38
Tabelle 4	Zusammenstellung v_{max} und K_m von D- und L-IPG bei 50 °C.	49
Tabelle 5	Werte von v_{max} und K_m von D-IPG durch integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei 50 °C.	51
Tabelle 6	Werte von v_{max} und K_m von D-IPG durch kleinste Fehlerquadrate bei 50 °C.	52
Tabelle 7	Vergleich von und K_m für Fed-Batch- und Batch-Prozess.	55
Tabelle 8	Angenommene Rahmen und Bedingungen für das Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess.	58
Tabelle 9	K_m und v_{max} Werte vom III. Plus Experiment.	63
Tabelle 10	K_m und v_{max} Werte vom IV. Plus Experiment.	66
Tabelle.11	Gesamte K_m und v_{max} –Werte vom D-IPG des Puls-Experiments.	67
Tabelle 12	K_m und v_{max} -Werte für L-Dopa des Pilzes <i>Tyrosinase</i> .	69
Tabelle 13	Für das Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess angenommene Rahmenbedingungen.	70
Tabelle 14	v_{max} und K_m Werte von 7,01 mmol/L L-DOPA bei 25°C.	79
Tabelle 15	v_{max} und K_m Werte von 10,1425 mmol/L L-DOPA bei 25°C.	81
Tabelle 16	Werte von v_{max} und K_m von L-DOPA durch kleinste Fehlerquadrate I Puls Exp.bei 25 °C.	82
Tabelle 17	Werte von v_{max} und K_m von L-DOPA durch kleinste Fehlerquadrate II Puls Exp. bei 25 °C.	84
Tabelle.18	Gesamte v_{max} und K_m –Werte vom L-DOPA des Puls-Experiments.	85

Abkürzungsverzeichnis

Zeichen	Einheit	Beschreibung
A		Signalfläche im Gaschromatogramm
A		Absorption
Abb.		Abbildung
bzw.		beziehungsweise
c	(mol/L)	Konzentration
°C	(°C)	Grad Celsius
<i>E</i>		Enzymkonzentration
E		Enantioselektivität
ee		Enantiomeric Excess (Enantiomerenüberschuss)
eeP		Produktenenantiomerenüberschuss
eeS		Substratenenantiomerenüberschuss
[ES]		Enzym-Substrat komplex
Fa.		Firma
FIM		Fischer Informationsmatrix
I		aus dem Medium verlassende Licht Intensität
ε		Absorptionskoeffizienten
I_0		in das Medium eindringende Licht Intensität,
IPG		Isopropylidenglycerin
IPGA		Isopropylidenglycerinacetat
h	(h)	Stunde
g		Gramm
ΔG		Gibbs- Energie
$\Delta\Delta G^*$		der Unterschied der freien Aktivierungsenergie zwischen dem D und L racamates
k		die Absorptionskonstante (bzw. Extinktionskonstante die beiden Bezeichnungen werden in der Literatur nebeneinander verwendet und sind identisch).
k'		Dekadischer oder Bunsenscher Absorptionskoeffizient.
K_m		Michaelis- Konstante

l		die Länge des Lichtweges im absorbierenden Medium
L-Dopa		L-3,4-dihydroxyphenylalanine
M	m	Molar
mg		Milligramm
min		Minute
ml		Millilitre
mM		Millimil
o		ortho
μl	μl	Mikroliter
P		Parametern
r	mol/s	Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion
$[S]$	(mol/L)	Substratkonzentration
$[S_0]$	(mol/L)	Konzentration des Substrates vor dem Reaktionsstart
T	(°C)	Temperatur
T_r	(°C)	racemisch Temperatur
Tab.		Tabelle
t	(h)	Zeit
U	Mmol/h	Umsatz
v	mol/s	Reaktionsgeschwindigkeit
v_{\max}	mol/s	Maximalgeschwindigkeit
v_{\max}^E	mol/s.h	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit pro Enzymkonzentration
V_{Substrat}	(L/s)	Volumenstrom der Substratzugabe
V_{Sample}	(L/s)	Volumenstrom der Probenahme
x		Variable
x		Molenbruch
X_R^S und X_S^S		Molbrüche der Eduktenantimere
X_R^P und X_S^P		Molbrüche der Produktenantimere
z.B.		zum Beispiel

1 Einleitung

Enzyme spielen in Organismen die Rolle von Katalysatoren, indem sie die chemischen Reaktionen der Gleichgewichtseinstellungen beschleunigen, ohne selbst dabei umgesetzt zu werden. Eine beschleunigende Wirkung auf chemische Reaktionen in Zellen ist für rasch ablaufende Lebensvorgänge oft von existentieller Bedeutung.

Seitdem Leonor **Michaelis** und Maud **Menten** erste Theorien [Michaelis-Menten-1913] über die Bindung und den Zerfall eines stabilen Enzym-Substrat Komplexes entwickelt haben, hat das Gebiet der Enzymkinetik einen außerordentlichen Aufschwung erlebt. Sowohl die Theorien als auch die Messmethoden über die Mechanismen enzymatisch katalysierter Reaktionen wurden weiterentwickelt bzw. verfeinert.

Um aktive Substanzen zu finden und intrazelluläre Handlungsweisen zu verstehen, wird die Untersuchung der Parameter (K_m und v_{max}) von Michaelis-Menten-Kinetik zunehmend wichtiger. Für die richtige Einschätzung jedes Enzyms, das in der Forschung verwendet wird, sind Informationen über die kinetischen Parameter entscheidend. Sie geben eine wesentliche Auskunft darüber, wie sich ein Enzym verhalten oder in gegebenen Situationen antworten wird.

Es gibt mehrere Forschungsfelder, in denen Enzyme verwendet werden, unter anderem in der medizinischen und pharmazeutischen Forschung sowie in der klinischen Diagnose. Zum Beispiel haben bestimmte Enzyme unveränderte Niveaus im Blut einer Person mit einer besonderen Krankheit, diese Enzyme könnten aber eine unterschiedliche Wirkung haben. In diesem Fall sind sowohl die Kenntnis von K_m und v_{max} als auch deren Bestimmungsmethoden für eine genauere Diagnose erforderlich [Murphy-2002].

Die einfachste Methode, um die Parameter zu erhalten, ist die grafische Darstellung (oder die lineare Regression) der transformierten Daten. Jedoch ist diese Methode nur im Falle der einfachen linearen Funktionen anwendbar, sie erbringt nicht ausreichend gute Resultate in einigen Fällen [Matyska-1985].

Die nichtlinearen Regressionsmethoden sind vielseitiger und geben zuverlässigere Parameterschätzungen für die Anpassung der kinetischen Gleichungen [Atkins-1975]. Es gibt zahlreiche, nichtlineare Regressionsmethoden, wobei keine von ihnen als die optimale Lösung für alle in der Enzym-Kinetik bekannten Beispiele betrachtet werden kann.

Jede Methode hat spezifische Anforderungen, was die experimentellen Werte selbst und besonders die Art ihrer Fehler betrifft. In der Praxis ist es normalerweise unbekannt, welche

Anforderungen am besten erfüllt werden. Deshalb erfolgt die Wahl der Methode häufig zufällig.

Um die Bestimmungsmethoden für K_m und v_{max} zu verbessern und mathematisch weiterzuentwickeln, hat es unterschiedliche Ansätze bzw. Anstrengungen gegeben. [Wilkinson-1961, Dowd-1965, Markus-1976, Cornish-Bowden-1991].

Die erste Abschätzung von Enzymparametern mit Hilfe von Computern wurde 1963 von Cleland präsentiert. Darauf basierend wurde 1977 von Goodwin die Bedeutung der Eingangssignale für die Parameterabschätzung von dynamischen Modellen ausführlich diskutiert. Durch die Messung der Reaktionsgeschwindigkeit bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen kalkulierte Endrenyi 1981 einen optimalen Versuchsplan zur Einschätzung der Michaelis-Menten Parameter. Einen experimentiellen Ansatz zur Bestimmung der Michaelis-Menten Parameter präsentierte Duggleby 1991, wobei aber nur die optimalen Anfangssubstratkonzentrationen analysiert wurden. Munack präsentierte 1991 einen systematischen Ansatz für die Optimierung der Abschätzung der Michaelis-Menten Parameter. Dabei analysierte er ausführlich die Auswirkungen von Zeit, Auswahlposition und Prozessdesign für die Anpflanzungsprozesse von gefütterten Mengen. 1996 betonte Ritchie die *nonlinear least-squares* Methode, mit der er zufriedenstellende Ergebnisse für die Abschätzung von K_m erhielt. Eine optimale Designmethode für die Penicillium-Chrysogenum-Gärung wurde 1988 von Syndall vorgestellt. Er versuchte einen genetischen Algorithmus für die Zufütterungsrate zu finden. Die skalaren Funktionen wurden von der Fischer-Informationsmatrix (FIM) optimiert, wobei sich damit die Verbesserung in der Parametereinschätzung maximierte.

Kakkar (2000) versuchte die minimale experimentelle Anstrengung für die Parameter einzuschätzen. Über den Einfluss der Enzymmenge in den Prozessen wird von Murphy (2002) berichtet. 2003 und 2004 präsentierte Murphy einen Bayesian-Ansatz für experimentelles Design, wobei die kinetischen Michaelis-Menten Parameter durch Simulationen kalkuliert wurden. Cornish-Bowden berichtete 2004 ausführlich über die Wirkung von experimentellen Fehlern auf die kinetischen Parameter. Durch die Analyse der Fischer-Informationsmatrix gelang Lindner (2006) zu dem Ergebnis, dass mit kleinem Volumenfluss der Substratmengen die Einschätzung der kinetischen Parameter verbessert wird.

Um die richtigen experimentellen Angaben zu erhalten, ist der grundsätzliche Startpunkt zum Sammeln kinetischer Informationen zu finden. Dafür ist eine systematische Versuchsplanung

notwendig, um die Messzeit und Versuchszahl zu optimieren. Durch einen sorgfältig vorbereiteten Versuchsplan können bezüglich der Information, Produktivität und Genauigkeit jedes Experimentes erhebliche Verbesserungen bei der Bestimmung der Parameter erreicht werden.

Erstmalig eingeführt von Fisher (1935), basiert optimales Versuchsdesign darauf, die manipulierbaren Faktoren, beziehungsweise Umweltbedingungen des Experiments, für *a priori* bestimmte Zwecke (bzw. Parameterschätzung, Modelldiskriminierung) so einzustellen, dass möglichst wenige Messungen mit jeweils möglichst hohem Informationsgehalt bezüglich des Zwecks gemacht werden können [Saltelli-2000].

In der Enzym-Kinetik gibt es viele Punkte, die bei der Erstellung des Versuchsplanes für eine optimale Leistungsfähigkeit genauer betrachtet werden müssen, unter anderem die Substratmenge und die benutzten individuellen Konzentrationen. Die Zahl der Wiederholungen und Datenpunkte können dabei die notwendige Auskunft geben, um zwischen den Modellen unterscheiden zu können und somit gute Parameter-Schätzungen zu erhalten [Murphy-2002]. Mehrere Anwendungen sowie die Vorteile des Versuchsplanes werden von Atkinson (1996) im Detail präsentiert. Auch im Gebiet der Bioprozess-Technik werden viele Anwendungen bereits veröffentlicht [Takors-1997, Wu-2003, De Oliveira-2004].

2 Zielsetzung

Das Hauptziel dieser Arbeit ist den Parametereinschätzungsfehler des Michaelis–Menten-Enzymkinetischen Prozesses genauer zu untersuchen, um analytisch das Suchgebiet von kinetischen Parametern zu reduzieren, sowie numerisch das Optimum für Parameter zu spezifizieren.

Hierzu werden zwei enzymatisch katalysierte Reaktionen als Modellprozesse untersucht: die Veresterung von Isopropylidenglycerin (IPG) mit Vinylacetat durch *Pseudomonas cepacia* in Hexan und die Umsetzung von L-3,4-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) durch aus Pilzen isolierte *Tyrosinase* in das gefärbte Dopachrom. Dabei werden die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} und die Michaelis-Menten-Konstante K_m mittels „die Methode der kleinsten Fehlerquadrate im Puls-System“ berechnet.

2.1 Der Einfluss von Temperatur und Enzymkonzentration auf die enzymatische Reaktion

Im ersten Schritt der vorliegenden Arbeit wird die Veresterung von Isopropylidenglycerol (IPG) mit Vinylacetat in Hexan untersucht, wobei der Einfluss von Temperatur und Enzymkonzentration auf die enzymatische Reaktion erforscht wird, um den Produktenantiomerenüberschuss zu steigern.

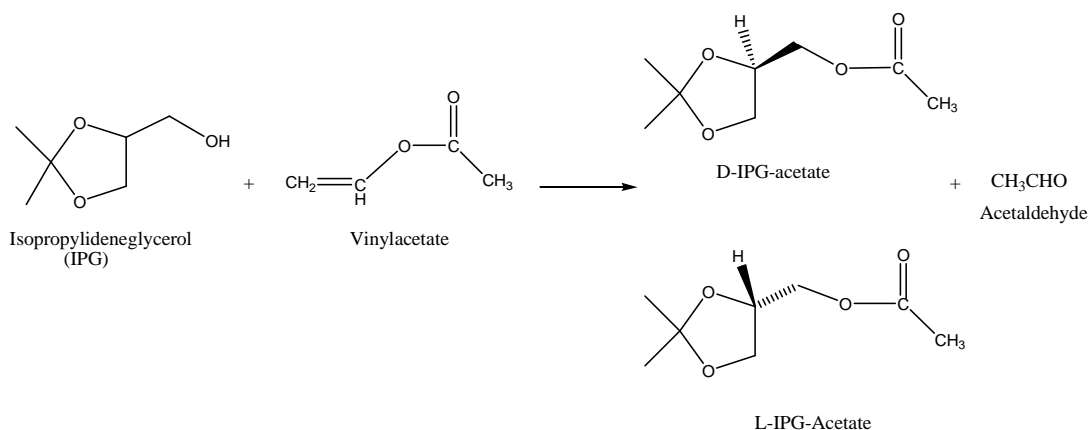


Abb. 1 Reaktion von Isopropylidenglycerin mit Vinylacetat.

Die Reaktion ist eine Transesterifizierung der Vinylkomponenten. Da der entstandene Vinylalkohol sofort zum entsprechenden Aldehyd tautomerisiert, wird das Reaktionsgleichgewicht auf die Produktseite verlagert. Ein asymmetrisches C-Atom der Alkoholkomponente der Reaktion ist für die Untersuchung mit Blick auf die Enantioselektivität von Interesse [Tservistas-1997].

Bei der Diskussion der Stereochemie ist zu beachten, dass es aufgrund der Veresterung der freien Hydroxylgruppe zu einer Änderung der Prioritätenfolge der Substituenten am chiralen Zentrum kommt. Als Produkt des (D)-IPG wird demzufolge das (L)-IPG Acetat erhalten (Abb.1).

In der chemischen Industrie gibt es eine zunehmende Nachfrage nach optisch reinen Enantiomeren [Crosby-1991]. Von vielen pharmazeutisch wirksamen chiralen Substanzen ist bekannt, dass lediglich ein Enantiomer voll wirksam ist, während das andere Stereoisomer eine geringere Wirkung zeigt oder bei Medikamenten sogar Nebenwirkungen hervorruft [Blumenstein-1997, Hedström-1993].

Zahlreiche pharmakologische Studien über die Enantiomere dieser racemischen Mischung haben gezeigt, dass das (D)-Isomer eine bedeutsam größere therapeutische Wirkung hat und die therapeutische Konzentration im Blut schneller erreicht als das (L)-Enantiomer [Zaks - 1997]. Die pharmakologische Aktivität ist hauptsächlich durch die D-Form gegeben, während die L-Form entweder untätig ist oder die aktive Form im Vergleich zur D-Form reduziert ist [Pietta-1987, Meyring-2000].

Immer mehr Medikamente werden als einzelne Enantiomere statt einer racemischen Mischung auf den Markt gebracht [Stinson-1998, Stinson-2000, Tucker-2000]. Organische Säuren und Aminosäuren stellen einen großen Teil dieses Marktes dar.

Viele Forscher haben versucht, diese optisch aktiven Enantiomere zu trennen [Chen-1987, Lee-2002]. Die Methoden (Kristallisierung usw.), um eines der Enantiomere aus der racemischen Mischung zu trennen, sind allgemein zeitraubend [Miyako-2004]. Eine angereicherte Mischung von Produktenantiomeren entsteht, wenn in einer enzymkatalysierten Reaktion ein racemisches Substrat enantioselektiv umgesetzt wird.

Ein enantioselektiver Biokatalysator reagiert bei der kinetischen Racematspaltung mit den beiden Enantiomeren des Racemats einer Zielverbindung mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten. Mit zunehmender Zeit reichert sich dadurch das langsamer umgesetzte Substratenantiomer an, bis die Reaktion bei genügend hohem Enantiomerenüberschuss gestoppt wird. Auch mit enantioselektiven Enzymen können jedoch enantiomerenreine Substanzen gewonnen werden [Chen 1987].

1,2-O-isopropylideneglycerol (IPG) auch Solketal genannt, ist ein wichtiges chirales Substrat, der für die Synthese von vielen optisch aktiven Enantiomeren wie Glycerophospholipide, β -Adrenoceptor Antagonists, PAF (Platelet Aggregating Factor) [Bhatia–1987, Peters–1987], Aryloxypropanolamine, Prostaglandinase [Stork–1977] und Leucotrienes dient. Diese werden in der Behandlung der Epilepsie und des Bluthochdrucks verwendet [Jurczak-1986, Molinari–2005].

Die chemische Synthese von IPG ist zu kostspielig für Industrieanwendungen, da es chirale Ausgangsmaterialien, Mehrstufenreaktionen und teure Trennungsvorgänge erfordert [Molinari-1996]. Trotz der Einfachheit der Reaktionen, sind die Herstellungskosten ziemlich hoch. So hat sich die Forschung auf die Entwicklung einer enzymatischen Methode konzentriert, die es erlaubt, ein enantiomerangereichertes Produkt mit hohen Erträgen und niedrigen Kosten zu produzieren [Molinari - 2003-Patent, Aragozzini-1989, Maconi-1990, Berglund-2007].

2.2 Bestimmung der Parameter K_m und v_{max} der Michaelis-Menten-Kinetik

Im zweiten Schritt werden die Veresterung von Isopropylidenglycerin (IPG) mit Vinylacetat in Hexan und die Oxidation von L-DOPA zu Dopachrom in einem Fed-Batch-Prozess (Puls-Experiment) durchgeführt, wobei die Parameter Reaktionsgeschwindigkeit (v_{max}) und Michaelis-Menten-Konstante (K_m) durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet werden.

Tyrosinase ist das Hauptenzym, das am Prozess der Melanin-Biosynthese teilnimmt. Die Oxidation von L-Tyrosine zu Dopachrom wird in zwei Schritten katalysiert und molekularer Sauerstoff dabei verbraucht.

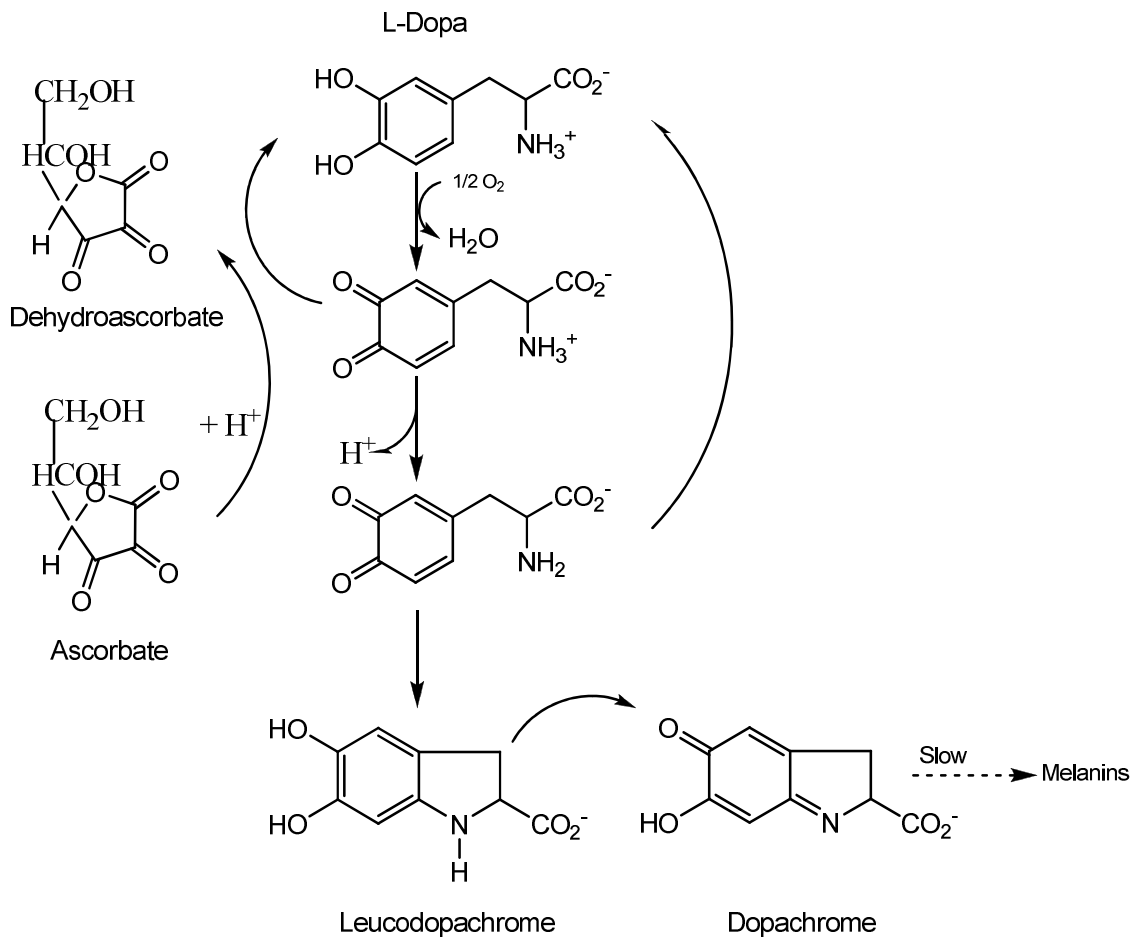


Abb.2 Raper-Mason-Lerner Reaktions-Mechanismen.

[Nur L-Dopa-Oxidation wird durch *Tyrosinase* katalysiert. In Gegenwart von Ascorbat wird Dopaquinon zurück in L-DOPA umgewandelt und keine anderen Zwischenglieder werden gebildet].

Der erste Schritt ist die o-Hydroxylation von Tyrosine zu L-DOPA, und der zweite ist die Oxidation von L-DOPA zu Dopachrom. Die Melanin-Biosynthese wurde zunächst von Raper [1928] vorgeschlagen und später von Lerner und Fitzpatrick [1950] durch das Umfassen der möglichen Oxidation von Leucodopachrom durch Dopaquinon ein modifiziert (Abb. 2).

Das zusammengesetzte L-3,4-dihydroxyphenylalanin (allgemein L-DOPA genannt) ist ein natürliches Substrat für dieses Enzym und wird in dieser Arbeit verwendet. Das L-DOPA wird in das gefärbte Dopachrom umgewandelt und die Konzentration spektralphotometrisch bestimmt.

Für die Ermittlung der Parameter wird ein experimentelles Annäherungsverfahren dargestellt, welches genau nach der Michaelis-Menten Enzymkinetik abläuft. Dieses kinetische Verfahren ist ausschließlich nur für Enzymreaktionen gültig, die irreversibel sind. Für eine gute Annäherung an die realen Werte der Parameter ist es Voraussetzung, dass grobe Schätzungen der Parameter im Voraus bekannt sein müssen.

Auf die großen standardmäßigen Fehler der berechneten K_m - und v_{max} -Werte wird in den meisten Abfassungen in der Biochemie nicht weiter eingegangen, obwohl die statistischen Beschränkungen von K_m und v_{max} seit langem bekannt sind.

Kalkulationen von den Abweichungen oder standardmäßige Fehler von K_m - und v_{max} wurden im Allgemeinen außer Acht gelassen. Das kann irreführend sein, da die Fehler von K_m - sehr groß sein können, auch wenn der Korrelations-Koeffizient r seinem Wert in der Literatur nah ist [Reimond 1996].

In der vorliegenden Dissertation soll gezeigt werden, dass die nichtlineare kleinste Quadratmethode nicht nur die zufriedenstellendste und robuste Methode für die Bestimmung von K_m ist, sondern auch zuverlässige Schätzungen von K_m für eine breite Palette von gewählten Substrat-Werten und Abstand-Strategien sicherstellen.

Die Güte der Anpassung wird analytisch basierend auf der Fischer Informationsmatrix analysiert. Deren Inverse gibt die Abweichung der unteren Grenze der Parameterschätzung wieder. Numerische Lösungen der Experimente werden dargestellt, die unter der Bedingung durchgeführt werden, dass eine spezifische Menge des Enzyms, Substrat- und Lösungsvolumens gegeben und die Zahl der Messungen festgelegt sind. Weitere Bedingungen sind angewandt worden. Z.B. können die Messungen nicht gleichzeitig zur Analyse der Stabilität der Verfahren benutzt werden. Mit und ohne Bedingungen wird das Verfahren des optimalen Experimentes unter Benutzung von Simulationen durchgeführt und analysiert.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Michaelis – Menten – Gleichung.

Enzyme sind im allgemein Proteine. Ein Proteinmolekül ist durch seine Aminosäuresequenz und durch eine Tertiärstruktur bestimmt. Der Grund für die enzymatische Eigenschaft liegt in der Anordnung und der Art der Aminosäureseitenketten. Aufgrund der Aminosäuren, die durch ihre räumliche Nähe zueinander (Konformation) gekennzeichnet sind, verändern sich die Eigenschaften der Seitenketten. Dadurch wird eine eindimensionale Information in eine dreidimensionale Struktur transformiert. Nur so kann ein Protein katalytisch aktiv sein.

Die enzymatische Reaktion fängt mit dem Enzym $[E]$ und mit dem Substrat $[S]$ unter Bindung eines Enzym-Substrat-Komplexes $[ES]$ an. Hierbei wird eine Art von Übergangszustand durchlaufen. Diese Übergangsaktivierungsenergie ist sehr gering. Nach diesem Vorgang wird dieser $[ES]$ -Komplex aktiviert. An dieser Stelle werden kovalente Bindungen gelöst und neue kovalente Bindungen geknüpft. Hier benötigt der $[ES]^*$ -Komplex die größte Energie. An dieser Stelle wird der $[ES]^*$ -Komplex zum Enzym bzw. zum unveränderten Substrat zurück zersetzt oder es bildet sich das Produkt.

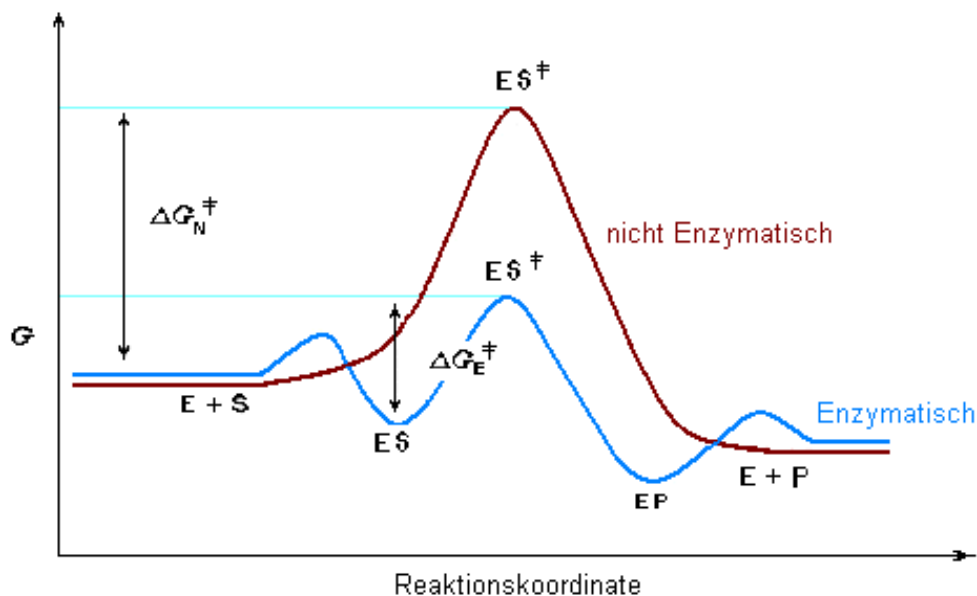
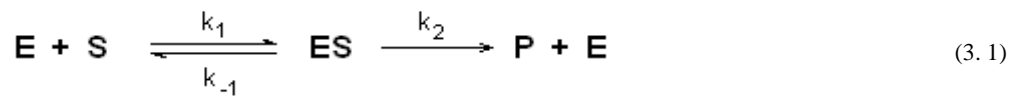


Abb. 3 Energie und Reaktionskoordinatendiagramm.

Die enzymatische Spaltung eines Substrats S kann mit nachfolgender Gleichung dargestellt werden.



Für die zeitliche Änderung der einzelnen Reaktionspartner ergeben sich folgende Differentialgleichungen:

$$\frac{d[\text{S}]}{dt} = -k_1[\text{S}][\text{E}] + k_{-1}[\text{ES}] \quad (3.2)$$

$$\frac{d[\text{E}]}{dt} = -k_1[\text{S}][\text{E}] + (k_{-1} + k_2)[\text{ES}] \quad (3.3)$$

$$\frac{d[\text{ES}]}{dt} = k_1[\text{S}][\text{E}] - (k_{-1} + k_2)[\text{ES}] \quad (3.4)$$

$$\frac{d[\text{P}]}{dt} = k_2[\text{ES}] = v \quad (3.5)$$

Als Umsatzgeschwindigkeit v wird die Produktzunahme definiert, die nach Gleichung (3. 5) der Konzentration des Enzym- Substrat-Komplexes $[\text{ES}]$ direkt proportional ist. Diese hängt wiederum von der Menge der Reaktionspartner ab. Zur Lösung der Differentialgleichungen wäre die Kenntnis der zeitlichen Konzentrationsveränderungen der Reaktionspartner erforderlich, was vor allem für $[\text{E}]$ und $[\text{ES}]$ experimentell kaum möglich ist.

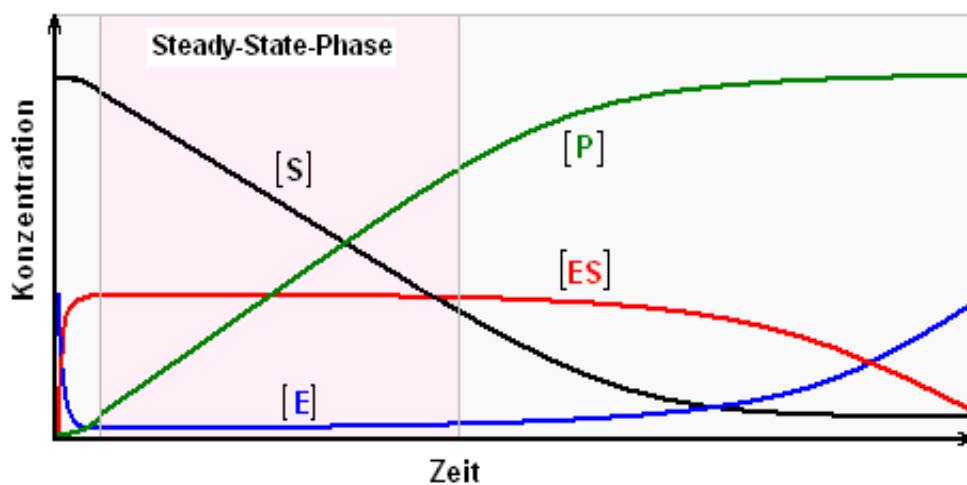


Abb.4 Zeitliche Veränderung der Reaktionspartner einer enzymkatalysierten Reaktion.

In Abbildung 4 sind solche Veränderungen aller beteiligten Reaktionspartner unter Vorgabe bestimmter Konstanten berechnet. Drei Phasen sind deutlich zu unterscheiden:

- Eine kurze Anfangsphase, die gekennzeichnet ist durch die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes bei gleichzeitiger Abnahme des freien Enzyms. In diesem Bereich ist die Umsatzgeschwindigkeit noch gering.
- Eine mittlere Phase, in der sich die Konzentration des Enzym-Substrat-Komplexes nur wenig ändert; die Umsatzgeschwindigkeit erreicht hier ihren maximalen Wert.
- Die letzte Phase ist geprägt durch den Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes infolge der Erschöpfung des Substratüberschusses. Die Umsatzgeschwindigkeit nimmt hierbei wieder ab.

Durch Variation der Geschwindigkeitskonstanten ändern sich die relativen Bereiche der drei Phasen. Sind alle Konstanten vergleichbar groß, dann ist die Dauer der mittleren Phasen relativ kurz, die Konzentration von $[ES]$ erreicht zu keinem Zeitpunkt einen konstanten Wert.

Stellt sich dagegen das vorgeschaltete Gleichgewicht im Vergleich zur Enzymkatalyse rasch ein (eine durchaus plausible Annahme), also $k_1 \approx k_{-1} > k_2$, dann verlängert sich die mittlere Phase auffallend. Die Konzentration des Enzym-Substrat Komplexes bleibt für eine beachtliche Zeitdauer nahezu unverändert. In diesem Bereich halten sich Bildung und Zerfall des Enzym-Substrat-Komplexes gerade die Waage, es herrscht ein gleichgewichtsähnlicher Zustand, der aber nur für eine begrenzte Zeit stabil ist. Zum Unterschied von einem echten Gleichgewicht wird dieser Zustand mit dem englischen Begriff *Steady-State* (Fließgleichgewicht) bezeichnet.

In diesem Bereich beobachtet man, als Folge der Konstanz des Enzym-Substrat-Komplexes, eine lineare Substratabnahme bzw. Produktbildung. Die Reaktion wird nullter Ordnung hinsichtlich des Substrats.

Da die zeitliche Änderung von einem Enzym-Substrat-Komplex und einem freien Enzym

$$d[ES]/dt = d[E]/dt = 0 \quad (3.6)$$

gesetzt werden kann, vereinfacht sich die Gl. (3.3) und Gl. (3.4)

$$k_1[S][E] = [k_{-1}[ES] + k_2[ES]] \Rightarrow k_1[S][E] = [ES][k_{-1} + k_2] \quad (3.7)$$

Die Konzentrationen vom Enzym-Substrat-Komplex $[ES]$ und vom freien Enzym $[E]$ sind in der Reaktionslösung unbekannt, jedoch ergeben sie zusammen die Gesamtkonzentration von Enzym $[E_0]$:

$$E_0 = [E] + [ES] \Rightarrow [E] = E_0 - [ES] \quad (3.8)$$

Einsatz von (3.7) in (3.6) liefert:

$$k_1[S]E_0 - [ES] = [k_{-1} + k_2][ES]$$

$$\Rightarrow [ES] = \frac{|S|E_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + |S|} \quad (3.9)$$

$$\Rightarrow K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} = \text{Michaelis-Menten-Konstante} \quad (3.10)$$

$$[ES] = \frac{[S]E_0}{K_m + [S]} \quad (3.11)$$

$$\frac{dP}{dt} = v = k_2[ES] = k_2 \frac{E_0[S]}{K_m + [S]} \quad (3.12)$$

$$v_{\max} = k_2^* E_0 \quad k_2 = v_{\max}/E_0 \quad (1/\text{sekunden}) \quad (3.13)$$

$$\Rightarrow r = v = \frac{dP}{dt} = v_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad \text{Michaelis-Menten-Gleichung} \quad (3.14)$$

Dabei bedeuten:

[S] : Substratkonzentration

[S]₀ : Substratkonzentration bei Beginn der Reaktion

r = v : Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion bei der entsprechenden Substratkonzentration

v_{\max} : Die Maximalgeschwindigkeit der enzymatischen Reaktion ist definiert als eine nur theoretisch erreichbare Maximalgeschwindigkeit nach der Theorie von *Michaelis-Menten*.

K_m : *Michaelis-Menten-Konstante*

Ein wichtiges Maß für die Affinität eines Enzyms zu einem Substrat ist K_m . Eine hohe Michaelis-Konstante zeigt eine niedrige Affinität des Enzyms zum Substrat und bedeutet, dass bei relativ hohen Substratkonzentrationen die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird und das Enzym nicht sehr bindungsfreudig ist. Eine niedrige Michaelis-Konstante hingegen zeigt eine hohe Affinität des Enzyms zum Substrat, welches man daran erkennt, dass schon bei relativ niedrigen Substratkonzentrationen die halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird. Das Enzym ist offensichtlich bindungsfreudig.

Der Quotient aus v_{max} / K_m gilt als Indikator für die Substratempfindlichkeit gegenüber der enzymatischen Reaktion unter substratgesättigten Bedingungen. Je höher das Verhältnis, desto größer ist die Empfindlichkeit [McCarthy, 1997].

3.2 Integrierte Michaelis-Menten-Gleichung

$$r = v = - \frac{d[S]}{dt} = v_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad - \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{K_m + [S]}{[S]} d[S] = v_{\max} \int_0^t dt \quad (3.15)$$

$$\Rightarrow - \int_{[S]_0}^{[S]} \frac{K_m}{[S]} d[S] - \int_{[S]_0}^{[S]} d[S] = v_{\max} \int_0^t dt \quad (3.16)$$

Die Integration von (3.16) führt zu Gleichung 3.17.

$$K_m \ln \frac{[S]_0}{[S]} + [S]_0 - [S] = v_{\max} t \quad (3.17)$$

Der Umsatz wird ausgedrückt mit $U = \frac{[S]_0 - [S]}{[S]_0}$ bzw.

$$[S] = [S]_0 (1 - U) \quad (3.18)$$

$$\frac{t}{U} = \frac{K_m}{v_{\max}} \left[\frac{1}{U} \ln \left(\frac{1}{1-U} \right) \right] + \frac{[S]_0}{v_{\max}} \quad (3.19)$$

Bei einer Auftragung von t/U gegen $[(1/U) * \ln(1/(1-U))]$ wird eine Gerade erhalten, die die Ordinate im Punkt $[S]_0/v_{\max}$ schneidet und die Steigung K_m/v_{\max} ist.

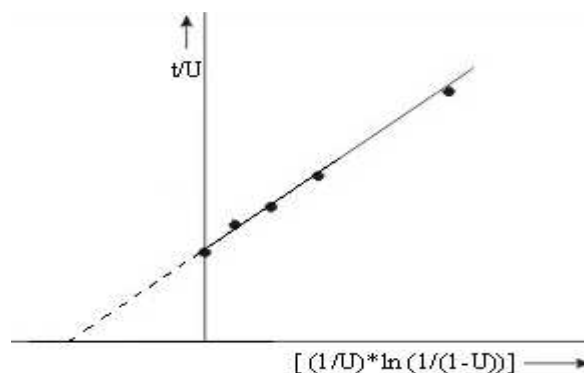


Abb. 5 Auftragung der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung.

3.3 Die Methode der kleinsten Quadrate

Das angewendete mathematische Standardverfahren in Ausgleichsrechnung stellt die Methode der kleinsten Quadrate dar. Es wird in einer Datenpunktwolke eine Kurve gesucht, die möglichst nahe an den Datenpunkten verläuft.

Zwar ist die Lineweaver-Burk-Beziehung eine algebraisch korrekte Transformation der Michaelis-Menten-Gleichung

$$r = v = \frac{dP}{dt} = v_{\max} \frac{[S]}{K_m + [S]},$$

ihre Anwendung liefert aber nur korrekte Ergebnisse, wenn die Messwerte fehlerfrei sind. Die Realität wird nur mit einer erweiterten Michaelis-Menten-Beziehung dargestellt. Folgend wird die Gleichung mit e^i als Fehlerparameter beschrieben:

$$v_i = \frac{V_{\max}[S_i]}{K_m + [S_i]} (1 + e_i) v_i$$

Diese Gleichung lässt sich nicht mehr linearisieren, so dass hier die Lösung iterativ ermittelt wird.

Die Formel der kleinsten Quadrate wird hier verwendet:

$$\sum_{i=1}^N \delta_i^2 = \sum_{i=1}^N [v_i - v_{th}^i]^2 = \sum_{i=1}^N \left[v_i - \frac{v_{\max} S_i}{K_m + S_i} \right]^2$$

Der δ_i - Fehler stellt den Unterschied zwischen dem experimentellen v_i und theoretischem v_{th}^i -Wert dar. Die Zahl von experimentellen Punkten wird durch S_i und N angezeigt [Jericevic-2005].

3.4 Enantioselektivität

Der Enantiomerenüberschuss (% ee, *enantiomeric excess*) ist ein Maß für die Enantiomerenreinheit. Der Substratenantiomerenüberschuss (eeS) und der Produktenantiomerenüberschuss (eeP) können aus den Molenbrüchen der jeweiligen Enantiomeren berechnet werden.

$$eeS = \left| \frac{(X_R^S - X_S^S)}{(X_R^S + X_S^S)} \right| * 100 \% \quad (3.20)$$

$$eeP = \left| \frac{(X_R^P - X_S^P)}{(X_R^P + X_S^P)} \right| = 100 \% \quad (3.21)$$

Dabei bedeuten:

X_R^S und X_S^S = Molenbrüche der Eduktenantimere

X_R^P und X_S^P = Molenbrüche der Produktenantimere

Die Signalflächen, die im Gaschromatogramm erhalten werden, sind direkt mit den Molenbrüchen proportional. Deshalb kann es in dieser Form in der Gleichung eingesetzt werden.

Der Umsatz U der Reaktion kann über die Enantiomerenüberschüsse bestimmen:

$$U = \frac{eeS}{eeS + eeP} * 100 \% \quad (3.22)$$

Die Enantioselektivität E ist im Idealfall für jede Reaktion eine charakteristische konstante Zahl und unabhängig von der Substratkonzentration und vom Umsatz. Nach Chen [1996] kann die Enantioselektivität aus der Gleichung (3. 23) und (3. 24) bestimmt werden:

$$E = \frac{\ln[(1-U)(1-eeS)]}{\ln[(1-U)(1+eeS)]} \quad (3.23)$$

$$\text{bzw. } E = \frac{\ln[1-U(1+eeP)]}{\ln[1-U(1-eeP)]} \quad (3.24)$$

3.5 Die Fischer-Informationsmatrix für Enzymkinetik

Um unbekannte Parameter von einem Prozess, welches durch ein dynamisches Modell beschrieben wird, zu bestimmen,

$$\frac{dx}{dt} = f(x, t, P)$$

(x Variable, t Zeit, P Parameter) müssen Messungen durchgeführt werden.

X und P können Vektoren sein.

Unter der Verwendung des Mess-Modells

$$y^E(t_i) = g(x, t_i, P)$$

kann der Funktionswert $y^E(t_i)$ für eine bestimmte Zeitperiode i geschätzt werden, wo die entsprechenden Messungen y_i^M durchgeführt werden.

Hier ist die Differenz der gemessenen und der geschätzten Variablen durch die Inverse des Messkovarianzfehlers c_i^{-1} gewichtet, um verschiedene Messqualitäten zu berechnen und dann über alle N durchgeführten Messungen zu summieren.

$$F^2 = \sum_i^N (y_i^M - y^E(t_i))^T C_i^{-1} (y_i^M - y^E(t_i))$$

Wenn mehr als ein Messgerät verwendet wird, sind dort ebenso Vektoren. Um die unbekannten Parameter P des dynamischen Modells zu bestimmen, muss die Kriterienfunktion F^2 minimiert werden. Die Krümmung dieser Funktion im Minimum ist der Entscheidungsfaktor dafür wie exakt die Parameter durch die gewählten Messungen sowie durch den spezifischen Prozessentwurf bestimmt werden können.

Um diese Abhängigkeit zu analysieren, muss der Einfluss der Parameter auf den geschätzten Werten der Messungen in dieser Funktion betrachtet werden.

Das führt zu Differenzialgleichungen für die Zustandempfindlichkeiten, die zusammen mit dem dynamischen Prozessmodell gelöst werden müssen. Die numerische Lösung verwendend, können die Produktionsempfindlichkeiten sowie die FIM [Goodwin und Payne, 1977] berechnet werden.

Folglich hängt diese Matrix (Zustandgleichungen) vom Prozessdesign, der Zahl N und vom Zeitpunkt t_i , in dem die Messungen durchgeführt wurden, sowie von der Messfehler-Kovarianz C_i ab.

Wie zuvor erwähnt, hängt das Kriterium, wie gut die Parameter geschätzt werden, von der Biegung des Hyper Bereichs ab, der wie folgt definiert wird:

$$\Delta P^T \left[\sum_i^N Y_P(x_0, t_i, P_0)^T C_i^{-1} Y_P(x_0, t_i, P_0) \right] \Delta P$$

Die Krümmung des Funktionskriteriums kann durch die Eigenwerte der FIM berechnet werden. Je größer die Eigenwerte sind, desto größer ist die Krümmung und desto stabiler die Parameterwerte.

Diese untere Grenze gibt die minimale Abweichung der Parameterwerte, die theoretisch durch die gewählten Messungen erhalten werden können, wieder.

Daher, neben der unteren Cramer-Rao Grenze, ist der kleinste Eigenwert ein Indiz für die Güte der Parameterschätzung und folglich des optimalen Experimentendesigns. Das letzte Kriterium (der kleinste Eigenwert sollte so hoch sein wie möglich) wird das E-Kriterium genannt und wurde im Rahmen dieser Arbeit angewendet; weitere Kriterien werden in der Literatur genannt [Pukelsheim-1993, Goodwin-1987].

Um das optimale Design eines Prozesses für die Abschätzung der enzymkinetischen Parameter zu finden, wird die FIM für jede Fed-Batch-Methode eines enzymatischen Prozesses berechnet. Durch die Analyse der FIM werden nützliche Beschränkungen für das Prozess-Design abgeleitet.

Wenn der Batch oder der fed-Batch Modus berücksichtigt werden soll, müssen die Variationen in der Substratkonzentration, der Enzymkonzentration und das Volumen berücksichtigt sein. Von Massen und Volumengleichgewichten folgt:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} S \\ E \\ V \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} f_1 \\ f_2 \\ f_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{(S_0 - S)\dot{V}_{Substrate}}{V} - \frac{\dot{V}_{Enzyme}}{V} S - \frac{v_{max}ES}{K_m + S} \\ \frac{(E_0 - E)\dot{V}_{Enzyme}}{V} - \frac{\dot{V}_{Substrate}}{V} E \\ \dot{V}_{Substrate} + \dot{V}_{Enzyme} - \dot{V}_{Sample} \end{pmatrix}$$

Auf Grund der drei Zustandsgrößen des dynamischen Prozessmodells (S , E und V) und die zwei unbekannten Parameter (v_{max} und K_m) 3x2 wird die folgende Matrix erhalten:

$$\begin{pmatrix} \dot{S}_{v_{max}} & \dot{S}_{K_m} \\ \dot{E}_{v_{max}} & \dot{E}_{K_m} \\ \dot{V}_{v_{max}} & \dot{V}_{K_m} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial S} & \frac{\partial f_1}{\partial E} & \frac{\partial f_1}{\partial V} \\ 0 & \frac{\partial f_2}{\partial E} & \frac{\partial f_2}{\partial V} \\ 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} S_{v_{max}} & S_{K_m} \\ E_{v_{max}} & E_{K_m} \\ V_{v_{max}} & V_{K_m} \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} \frac{\partial f_1}{\partial v_{max}} & \frac{\partial f_1}{\partial K_m} \\ 0 & 0 \\ 0 & 0 \end{pmatrix}$$

Die Bestandteile, wo die Funktionen f_i nicht von der Variablen Enzymkonzentration abhängen, werden zu null gesetzt. Deswegen bleiben nur zwei Empfindlichkeiten übrig: $S_{v_{max}}$ und S_{K_m}

$$\dot{S}_{v_{max}} = \left(-\frac{\dot{V}_{Substrate} + \dot{V}_{Enzyme}}{V} - \frac{v_{max}E}{K_m + S} + \frac{v_{max}ES}{(K_m + S)^2} \right) \dot{S}_{v_{max}} - \frac{ES}{K_m + S}$$

$$\dot{S}_{K_m} = \left(-\frac{\dot{V}_{Substrate} + \dot{V}_{Enzyme}}{V} - \frac{v_{max}E}{K_m + S} + \frac{v_{max}ES}{(K_m + S)^2} \right) \dot{S}_{K_m} + \frac{v_{max}ES}{(K_m + S)^2}$$

In dieser Untersuchung ist das Substrat die einzige Variable, die gemessen wird. Weil das Substrat direkt gemessen wird, wird das folgende Messmodell erhalten:

$$S^E(t_i) = g(x, t_i, P) = S(t_i)$$

mit den entsprechenden Messabweichungen σ_i . Die Ausgangsempfindlichkeiten ergeben sich somit zu:

$$Y_{v_{max}}^E = S_{v_{max}} \text{ und } Y_{K_m} = S_{K_m}$$

und folglich wird die FIM gegeben durch:

$$FIM = \begin{pmatrix} \sum_i^N \left(\frac{(S_{v_{max}}(t_i))^2}{\sigma_i} \right) & \sum_i^N \left(\frac{S_{v_{max}}(t_i)S_{K_m}(t_i)}{\sigma_i} \right) \\ \sum_i^N \left(\frac{S_{K_m}(t_i)S_{v_{max}}(t_i)}{\sigma_i} \right) & \sum_i^N \left(\frac{(S_{K_m}(t_i))^2}{\sigma_i} \right) \end{pmatrix}$$

Die Inverse von FIM gibt die Cramer-Rao Untergrenze der Kovarianz des Parameterschätzungsfehlers. Je höher die Empfindlichkeiten sind, desto kleiner sind die entsprechenden Kovarianzen und desto besser die bestimmten Parameter. Wenn die Messabweichungen für alle Messungen gleich sind, dann ist jedes Element des Inversen von FIM zur Abweichung proportional. Deshalb sind die Cramer-Rao Untergrenzen der Kovarianz des Parameterschätzungsfehlers ebenso proportional zur Abweichung.

Um die Krümmung des Funktionskriteriums zu analysieren, muss der nicht-konstante Teil seines Erwartungswertes weiter betrachtet werden.

Wenn der FIM positiv bestimmt wird, welches immer der Fall ist, weil die Empfindlichkeiten höher als die Co-Empfindlichkeiten sind, hängt die Krümmung K des oben erwähnten Ausdrucks mit den Eigenvektoren λ von FIM durch $K=2\lambda$ zusammen. Die Eigenwerte von FIM sind:

$$\lambda_{1/2} = \sum_{i=1}^N \frac{(S_{v_{max}}(t_i))^2 + (S_{K_m}(t_i))^2}{2\sigma_i} \pm \sqrt{\left(\sum_i^N \frac{(S_{v_{max}}(t_i))^2 - (S_{K_m}(t_i))^2}{2\sigma_i} \right)^2 + \left(\sum_i^N \frac{S_{K_m}(t_i)S_{v_{max}}(t_i)}{\sigma_i} \right)^2}$$

Wenn die Messfehlerabweichungen σ_i in Bezug auf alle Messpunkte konstant sind, dann sind die Eigenwerte direkt proportional zu $1/\sigma$ und werden nur durch die Empfindlichkeit bestimmt. Je höher die Messfehlerabweichung ist, desto niedriger sind die Eigenwerte und desto schlechter können die Parameter identifiziert werden.

Die optimalen Messpunkte werden ausschließlich durch die Entwicklung der Empfindlichkeit bestimmt. Wenn jedoch die Abweichungen σ_i sich in Abhängigkeit des Messwertes ändern, dann wird der entsprechende Wert jedes Quotienten der Summe dadurch beeinflusst.

Die Ausdrücke mit einem erheblich niedrigeren σ_i Wert beeinflussen die Eigenwerte mehr als die mit einem höheren Wert. Normalerweise hängt die Messfehlerabweichung vom betrachteten Messsystem ab. Als erste Vermutung sollte ein konstanter Wert in Ordnung sein, aber eine (lineare) Zunahme der Messfehlerstandardabweichung ($=\sqrt{\sigma_i}$) in Bezug auf den Messwert ist nicht ungewöhnlich.

Von der oben genannten Gleichung kann man sehen, dass der kleinste Eigenwert der mit dem Minuszeichen vor der Quadratwurzel ist. Um den Wert des kleinsten Eigenwerts (E-Kriterium) zu maximieren, muss man den ersten Ausdruck maximieren und den Wert der Quadratwurzel minimieren.

Dieser Wert ist erfüllt, wenn nicht nur die Empfindlichkeiten hoch sind, sondern auch, wenn an manchen Messpunkten das $\left(S_{v_{max}}(t_i)\right)^2$ höher sein sollte als $\left(S_{K_m}(t_i)\right)^2$ und umgekehrt. Das Produkt der Empfindlichkeiten $S_{K_m}(t_i)S_{v_{max}}(t_i)$, deren Summe im zweiten Ausdruck der Quadratwurzel ist, sollte klein sein.

Deshalb sind nur hohe Empfindlichkeitswerte ungünstig. In Bezug auf diesen Ausdruck sind Empfindlichkeiten, die nicht linear abhängig sind, vorteilhaft.

Der Analyse zufolge ist ein Fed-Batch- Prozess in Bezug auf das Substrat (und nicht das Enzym) vorteilhafter im Vergleich zu einem Batch-Design. Jedoch kann ein definitives Optimum nur durch die numerische Lösung der Differenzialgleichungen unter verschiedenen Prozess-Bedingungen bestimmt werden.

3.6 Lipasen

Lipasen sind Serinesterasen, die in ihrem aktiven Zentrum eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat besitzen [Stryer-1991]. Sie sind wie Esterasen und Phospholipasen Triacylglycerid-Hydrolasen (EC 3.1.1.3.), die in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen als zelluläre und extrazelluläre Proteine vorkommen. Sowohl Lipasen als auch Esterasen sind α/β -Hydrolasen, d.h. sie weisen eine α/β -Faltung auf. Die Faltung besteht aus acht parallelen β -Faltblättern (Abb. 5), die auf beiden Seiten von α -Helices umgeben sind [Ollis-1992].

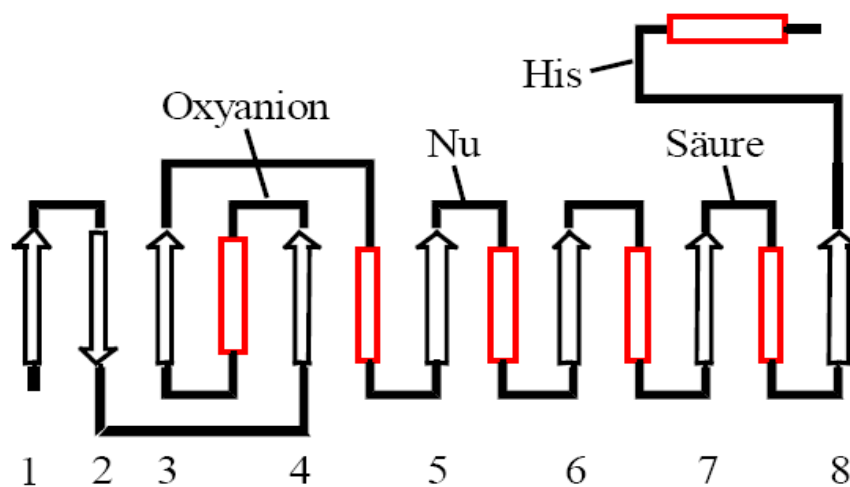


Abb. 6 α/β -Hydrolasefaltung von Lipasen.

β -Faltblätter sind als Pfeile, α -Helices als Rechtecke dargestellt. Die Bereiche der Bindungsstellen für den Acylrest (Säure), das Nukleophil (Nu), die Oxyaniontasche (Oxyanion) und das Histidin der katalytischen Triade sind ebenfalls eingezeichnet [Ollis-1992].

Lipasen heben sich von den Esterasen durch die Unterschiede im Substratspektrum ab. Lipasen bevorzugen wasserunlösliche Substrate, sind aber durchaus in der Lage, Triglyceride aus kurzkettigen Fettsäuren umzusetzen [Bornscheuer-2002, Bornscheuer-2005, Houde-2004]. Im Gegensatz dazu hydrolysieren Esterasen nur kurzkettige, wasserlösliche Substrate [Brockerhoff-1974]. Ein weiteres Unterscheidungskriterium begründet sich auf den Raumstrukturen. Lipasen haben einen Deckel über dem aktiven Zentrum, der bei Esterasen fehlt.

Bei Hydrolyse von wasserunlöslichen Substraten durch Lipasen kommt es zu einer Grenzflächenaktivierung. Im Gegensatz dazu zeigen Kristallstrukturen, die gebundene Übergangszustandsanaloge oder Triglyceride enthalten, die offene Konformation, bei welcher

der Deckel geöffnet ist und einen Zugang zum aktiven Zentrum erlaubt. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass die Grenzflächenaktivierung durch eine lipidinduzierte Veränderung der Deckelkonformation ermöglicht wird [Brady-1990, Grochulski-1993, Winkler-1990].

Gegen wasserlösliche Substrate zeigen Lipasen eine schlechte Aktivität, da der Deckel über dem aktiven Zentrum der Lipase geschlossen bleibt. Bei Bindung an eine hydrophobe Oberfläche, wie z.B. an einen Öltropfen, öffnet sich der Deckel und die katalytische Aktivität der Lipase erhöht sich. Diese Grenzflächenaktivierung stellt zudem einen wichtigen Unterschied zu den Esterasen dar, bei denen ein derartiger Effekt nicht beobachtet werden konnte.

Beim Reaktionsmechanismus von Lipasen erfolgt zunächst ein nukleophiler Angriff des Serins aus dem aktiven Zentrum an das Substrat; z.B. durch Abspaltung eines Alkohols entsteht im zweiten Schritt ein Acyl-Enzym-Komplex. Dabei übernimmt der Imidazolring des Histidins das freiwerdende Proton des Serins. Das negativ geladene Intermediat wird durch mehrere Aminosäurereste in der Oxyaniontasche stabilisiert. Anschließend erfolgt erneut ein nukleophiler Angriff an den Acyl-Enzym-Komplex, z.B. durch Wasser unter Bildung eines zweiten Intermediates, das dann in Produkt und Enzym zerfällt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt ist dabei die Freisetzung des Produktes, da die Bildung des Acyl-Enzym-Komplexes sehr schnell verläuft [Cambillau-1993, Derewenda-1992, Derewenda-1994, Dodson-1992]. Man nahm zunächst an, dass im Anschluss daran das Aspartat protoniert wird und verstand diese Triade daher als System zur Ladungsübertragung. Neutronenbeugungsanalysen zeigten jedoch, dass das Proton am Histidin bleibt und das Aspartat seine negative Ladung behält. Die Funktion der -COO⁻-Gruppe von Aspartat besteht vielmehr darin, die positiv geladene Form des Histidins im Übergangszustand zu stabilisieren [Stryer, 1991].

Die Zahl von verfügbaren Lipasen hat seit den 1980er Jahren beträchtlich zugenommen. Neben Ihrer natürlichen Funktion der Hydrolysierung von Carboxylhaltigen Esterbindungen, können Lipasen Esterifizierung, Interesterifikation und Umesterungsreaktionen, Alkoholyse, Säurehydrolyse und Aminolyse Reaktionen in nichtwässrigen Lösungen katalysieren. [Pandey-1999, Knežević-2004].

Diese vielseitige Verwendbarkeit macht Lipase für potenzielle Anwendungen in der Molkerei und den Lebensmittelindustrien, bei der Aromaproduktion, in den Duftkomponenten, in der Öl-chemischen-Industrie, in medizinischen Anwendungen [Mojović-1993, Knežević-1998, Lortie-1997, Bornscheuer-2002], in Reinigungsmitteln, Leder, Gewebe, Schönheitsmittel,

Papierindustrien [Houde-2004, Rathi-2001], in der Produktion optisch aktiver Zusammensetzungen für agrochemische und pharmazeutische Industrien unverzichtbar [Houde-2004, Zaks-1997, Rasor-2001]. Neben all diesen Anwendungen werden sie in der Synthese von organischen Zusammensetzungen eingesetzt, um enantiomerenreine Substrate aus Racematen zu erzeugen [Zuegg-1997]. Die Enantioselektivität kann um mehrere Methoden, z.B. die Abschirmung von Enzymen [Berglund-2001, Sandoval-2007], die Modifizierung von Substraten [Kawanami-2001, Gupta-1993] oder die Modulation von Reaktionsbedingungen verbessert werden.

Lipasen sind unter anderem in Milch, Ölsaaten, Cerealien, Obst und Gemüse sowie im Verdauungstrakt nachgewiesen worden [Berlitz-1992].

Somit ist es bewiesen, dass sie in Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen vorkommen [Bornscheuer-1999]. Deshalb unterscheidet man auch zwischen mikrobiellen Lipasen, tierischen Lipasen und Pilzlipasen.

Klassifizierung	Größe	Beispiele
Lipasen aus Säugetieren <i>Pankreaslipasen</i>	50 kDa	PPL
Lipasen aus Bakterien <i>Pseudomonas</i> Familie <i>Staphylococcus</i> Familie	30-35 kDa 40-45 kDa	PCL, PFL, CVL BTL2
Lipasen aus Pilzen <i>Candida rugosa</i> Familie <i>Rhizomucor</i> Familie	60-65 kDa 30-35 kDa	CRL, GCL, CE CAL-B, RML, ROL, HLL
Unklassifiziert		ANL, CAL-A, CLL

Tabelle 1 Klassifizierung kommerziell erhältlicher Lipasen nach Ähnlichkeiten in der Proteinsequenz [Bornscheuer-1999, Cygler-1993].

3.6.1 *Burkholderia cepacia* (*Pseudomonas cepacia*)

Lipase aus *Pseudomonas cepacia* (EG 3.1.1.3) ist ein berühmter Katalysator in der organischen Synthese für die Umsetzung von racemischen Mischungen von sekundärem Alkohol in der Hydrolyse, Esterifizierung und Umesterung [Schulz-2000]. Das gramnegative Stäbchenbakterium *B. cepacia* wurde 1950 zum ersten Mal von dem amerikanischen Mikrobiologen Walter Burkholder als Ursache einer Zwiebfäule (Zwiebel lat.: *cepa*) genannt [Burkholder-1950]. Ursprünglich zählte man diesen Organismus zur Familie der Pseudomonaden, bis Taxonomisten 1992 aufgrund geno- und phänotypischer Charakterisierungsstudien deutliche Unterschiede zu den *Pseudomonas spp.* feststellten und *P. cepacia* und andere Pseudomonaden in der neuen Familie *Burkholderia*, mit der Referenzspezies *B. cepacia*, zusammenfassten [Urakami-1994, Yabuuchi-1992, Zahao-1995]. Wegen ihrer genotypischen Vielfalt wird die Spezies *Burkholderia cepacia* heutzutage als ein aus verschiedenen sogenannten Genomovaren bestehender Komplex, der sogenannte *B. cepacia*-Komplex (*B. cepacia* complex, BCC) betrachtet [Ursing -1995].

In der Biotechnologie spielen Lipasen aus *Pseudomonas* eine wichtige Rolle, da sie eine große Vielseitigkeit in Bezug auf das Substratspektrum, die Reaktionsbedingungen und die Enantioselektivität besitzen. Zahlreiche mikrobielle Lipasen wurden sowohl biochemisch als auch molekulargenetisch charakterisiert. Die *Pseudomonas*-Lipasen gehören mit zu den intensivst untersuchten Lipasen. Die meisten *Pseudomonas*-Lipasen benötigen zusätzliche Proteine, ein sogenanntes Helferprotein (auch als Chaperone oder Refoldase bezeichnet), um zu einer korrekten Faltung in ihre aktive Konformation zu gelangen.

Die Unterteilung der *Pseudomonas*-Lipasen erfolgte aufgrund der Sequenzhomologie der Helferproteine der unterschiedlichen *Pseudomonas*-Stämme.

Aufgrund ihrer Pathogenität der vielen *Pseudomonas*-Stämme erfordern sie besondere Sicherheitsvorkehrungen bei ihrer Kultivierung.

PCL ist die einzige mikrobielle Lipase, die eine ausreichend hohe Enantioselektivität gegenüber einem breiten Spektrum an verschiedenen primären Alkoholen und außerdem noch gegenüber Carbonsäuren besitzt.

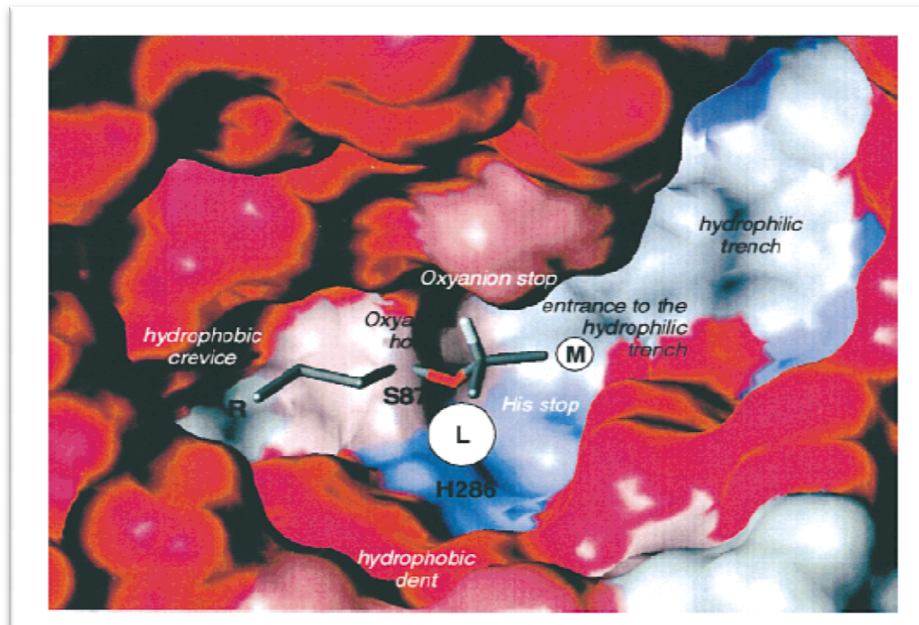


Abb.7 Berechnete Oberfläche der an Alkohol bindenden Seite der *P. cepacia* lipase. Gefärbt durch physikochemische Eigenschaften (blau-polar, rot-hydrophobic). Substitutionen am stereocenter des sekundären Alkohols werden mit *M* für den mittelgroßen substituent, *L* für den großen substituent abgekürzt und *R* vertritt die Fettsäurekette. Atomfarben von Substrataten sind für Kohlenstoff grau und für Sauerstoffatome rot. Das Wasserstoffatom wird am Stereozentrum gezeigt und weiß gefärbt [Schulz-2000].

3.6.2 *Tyrosinase*

Das Enzym *Tyrosinase* (EG 1.14.18.1, Polyphenol oxidase, PPO; Monophenol; Dihydroxy-L-phenylalanin; Oxidoreductase) enthält ein mehrfunktionelles Kupfer [Kahn-2007], welches die Oxidation (ortho-Hydroxylation) von Monophenol (Monophenolase Aktivität) und die Oxidation von O-Diphenols zu O-Chinon (Diphenolase Aktivität) katalysiert [Solomon-1996] und überall in Mikroorganismen, Pflanzen und Tieren vorzufinden ist.

Das enzymatische Bräunen in Gemüse, Pflanzen und Früchten wird durch die Tätigkeit von *Tyrosinase* in Pflanzengeweben verursacht [Oetting 2000]. Das Enzym wird mit der Parkinson-Krankheit und anderen neurodegenerativen Krankheiten in Verbindung gebracht [Xu-1998, Asanuma-2003]. Damit spielt *Tyrosinase* eine wichtige Rolle in den Gebieten der Medizin, Landwirtschaft und Industrie [Yasuyuki 2006].

Art	Vorkommen	Eigenschaft
1. Wahre Tyrosinase	Säugetiere, Vögel, Insekten, Fische und Pflanzen	oxidiert Mono - und Diphenole
2. Polyphenoloxydase	Süßkartoffeln und Teeblätter	oxidiert nur <i>o</i> -Diphenole
3. Protyrosinase	Mehlwurm und Grashüpfer Neurospora crassa	ist nur aktiv nach Behandlung mit Harnstoff
4. Hitzestabile	Mutanten von Neurospora crassa	hitzestabil

Tabelle 2 YASUNOBU unterscheidet nach Vorkommen und Eigenschaften vier verschiedene *Tyrosinase*-Enzyme.

Die aktive Seite von *Tyrosinase* besteht aus zwei Kupferatomen und drei Zuständen: `met', `deoxy' und `oxy' [Espin 2000].

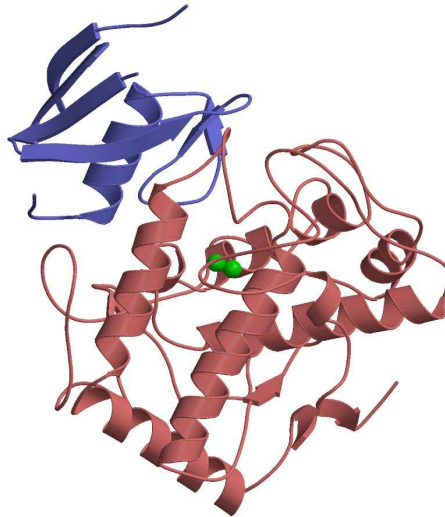


Abb. 8 Umfassende Struktur von Tyrosinase.
Stereofone Darstellung von dem Bandausschnitt der Kupfer-gebundenen Form des *Sekstaneoglobisporus Tyrosinase* Komplexes. Tyrosinase und ORF378 werden in Rot und Blau dargestellt. Vier der sechs identifizierten Kupferionen werden von grünen Bereichen angezeigt.

In den Säugetierzellen katalysiert *Tyrosinase* in zwei Schritten die Mehrstufenbiosynthese der Melanin-Pigmente zu Tyrosin. Die Reaktionsreihenfolge ist aus Melanocytes oder Pigmentzellen beschränkt. Das Melanin teilt der Haut, dem Haar und den Augen die Farben zu. *Tyrosinase* im Hautgewebe wird durch die ultraviolette Strahlung der Sonne aktiviert und verursacht dadurch eine größere Produktion von Melanin. Klassischer Albinismus wird durch einen Mangel an *Tyrosinase* verursacht.

4 Material und Methoden

4.1 Veresterung von IPG mit Vinylacetat in Hexan

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird als erstes die Veresterung von IPG mit Vinylacetat in Hexan untersucht. Zur Katalyse der Reaktion wird die Lipase (Fluka) aus *Pseudomonas cepacia* verwendet. Das Experiment wird im Batchansatz bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. In einem 20 ml Glaskolben wird 10 mmol IPG (Racemat) und 30 mmol Vinylacetat (Überschuss-Komponente) eingesetzt. Das Gesamtvolumen wird mit Hexan auf 10 ml aufgefüllt. Sobald 50 mg Lipase in der Lösung suspendiert sind, beginnt die Reaktion.

4.1.1 Reaktionsanlage für die Veresterung von IPG

Die Reaktion wird in einem Reaktor durchgeführt, der aus einem 20 ml Einhalskolben besteht. Dieser Reaktor (Glaskolben) wird in einem Wasserbad bis zur gewünschten Temperatur erhitzt. Die innerhalb des Reaktors befindliche Lösung wird mit einem Magnetrührer gerührt.

Diese Reaktionsanlage wird zusätzlich in einem Trockenschrank aufgebaut. Auf diese Weise können größere Temperaturschwankungen in der Lösung während der Probenahme vermieden werden.

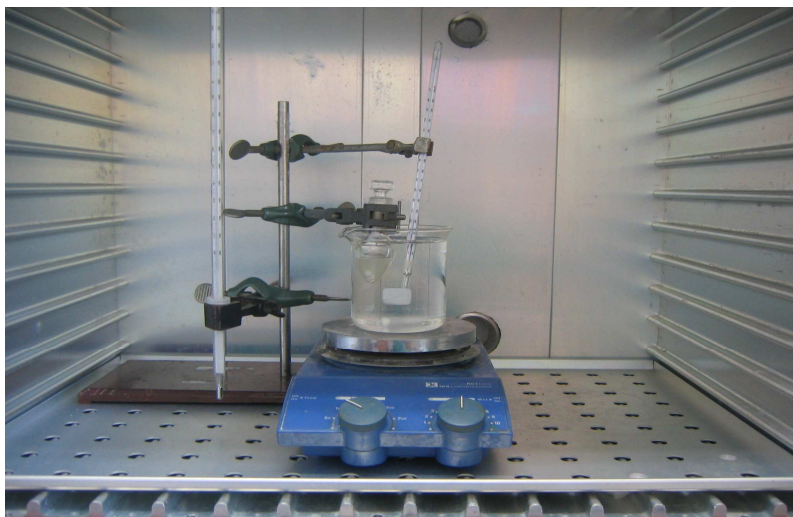


Abb. 9 Reaktionsanlage für das Hexan-Experiment.

4.1.2 Probenahme von Hexanexperimenten

Zur Verfolgung der Reaktion werden alle halbe Stunde bzw. stündlich, wenn die Reaktionszeit länger als zwölf Stunden dauert, jeweils 300 µl Probe genommen. Die Reaktion in der Probe wird durch Abzentrifugieren des Enzyms gestoppt. Anschließend wird die Probe zwanzigfach mit Aceton verdünnt und gaschromatographisch analysiert.

4.2 Die Oxidation von L-DOPA zu Dopachrom durch *Tyrosinase*

Neben der Veresterung von IPG wird in der vorliegenden Arbeit die Umsetzung von 3,4-Dihydroxyphenylalanin (DOPA) in das gefärbte Dopachrom untersucht, wobei die Reaktion über aus Pilzen isolierte *Tyrosinase* katalysiert wird.

Hierzu werden 50 ml 0,1 M NaH₂PO₄-Puffer (pH 7,0) vorbereitet und mit Sauerstoff angereichert. 2 mg/ml L-DOPA und 1000 units/ml *Tyrosinase* in dem Puffer zur Reaktion gebracht. Die Umwandlung von L-DOPA in das gefärbte Dopachrom wird photometrisch verfolgt.

L-DOPA und *Tyrosinase* werden im Kühlschrank aufbewahrt und vor Licht geschützt.

4.2.1 Reaktionsanlage für die Umsetzung von L-DOPA zu Dopachrom

Das Experiment wird im Batchansatz bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt. In einem 50 ml Glaskolben werden 10 mmol L-DOPA und 30 ml NaH₂PO₄-Puffer eingesetzt. Die Reaktion startet mit der Zugabe von 500 µl *Tyrosinase* (0,5 mg/ml).

Die Bildung des gefärbten Dopachroms wird im Spektralphotometer bei 475 nm für eine Dauer von 60 min verfolgt.



Abb. 10 Reaktionsanlage für das L-DOPA Puls - Experiment.

Die Messung erfolgte an einem CARY 50 SPECTROPHOTOMETER mit einem CARY PCB 150 WATER PELTIER SYSTEM zur Kontrolle der Temperatur. Das Gerät ist ein Zweistrahl-Spektralphotometer der Firma Shimadzu des Typs UV-2401PC mit einer Suprasil-Durchflussküvette (Hellma) der Schichtdicke 10 mm. Das Reaktionsgemisch wird über eine Gilson-Schlauchpumpe mit einer Geschwindigkeit von ca. 7 ml/Minute durch die Küvette gepumpt.

4.3 Chromatographie

Die Chromatographie ist eine physikalische Trennmethode, bei der die zu trennenden Komponenten zwischen zwei Phasen verteilt werden, von denen die eine stationär ist und die andere sich in eine Richtung bewegt. Die Trennung erfolgt durch unterschiedliche Verteilung der Komponenten zwischen der stationären und der mobilen Phasen und basiert auf den Wechselwirkungen, die in der Trennsäule zwischen der Probenkomponenten und der stationären Phase stattfinden. Diese zwischenmolekularen Wechselwirkungen werden in vier Gruppen (Orientierungskräfte, Induktionskräfte, Dispersionskräfte und spezifische, z.B. Donor-Akzeptor-Wechselwirkungen) geteilt. Dadurch laufen die Komponenten mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch die Säule und strömen nach unterschiedlichen Zeiten aus der Säule aus. Für die mobile Phase kommen die Aggregatzustände nur flüssig und gasförmig in Frage. Bei der Dünnschicht-, Säulen-, Papier- und Ionenaustauschchromatographie wird die mobile Phase im flüssigen Zustand verwendet.

4.3.1 Gaschromatographie

Bei Einsatz einer mobilen Phase im gasförmigen Zustand ergibt sich die **Gaschromatographie**. Die Probeneinführung, die Trennung und der Detektor sind die Bestandteile eines Gaschromatographen (Abb. 11).

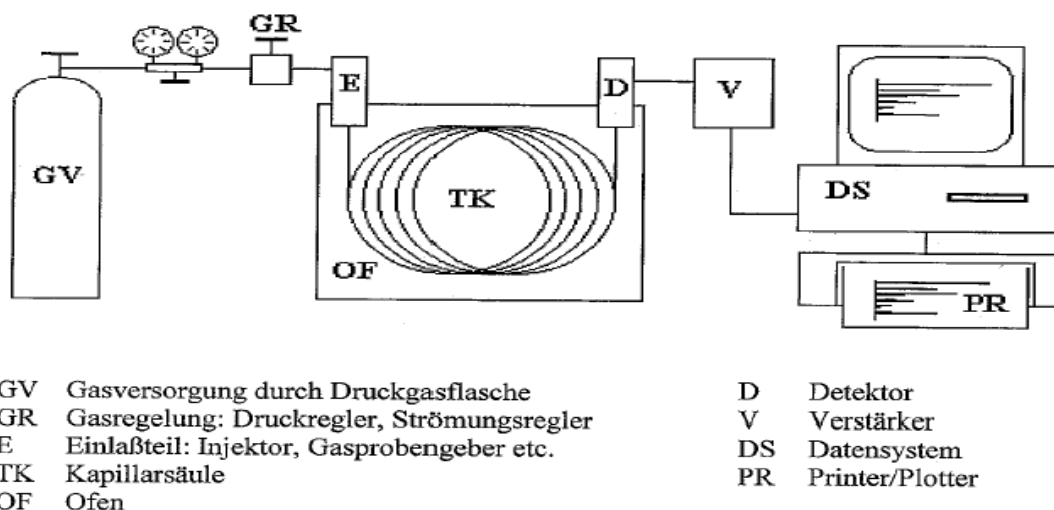


Abb. 11 Hauptbestandteile eines gaschromatographischen Systems.

An den für die vorliegende Arbeit verwendeten Gaschromatographen GC-14A (Shimadzu) ist ein Terminal, C-R4AX CHROMATOPAC, der gleichen Firma angeschlossen. Die Kapillarsäule besteht aus FS-Hydrodex[®] β -3P (Heptakis(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)- β -cyclodextrin) mit einer Länge von 25 m und einem Innendurchmesser von 0,25 mm (Macherey-Nagel).

Mit Hilfe einer Spritze wird die flüssige Probe (1 μl) durch ein Silikongummiseptum in die beheizte Zone (180 $^{\circ}\text{C}$) des Injektors eingespritzt. Nach dem Einspritzen wird die verdampfte Probe mit dem Trägergas (H_2) in die Trennsäule gespült. Die Trennsäule enthält die stationäre Phase, die entweder ein Adsorbens sein kann oder eine Flüssigkeit, die in Form eines dünnen Films auf der Oberfläche eines festen Trägers verteilt ist. In der vorliegenden Arbeit wird eine chirale Kapillarsäule verwendet, deren stationäre Phase aus Cyclodextrinen besteht. Dadurch kann das L- und D-Enantiomer getrennt werden.

Die Trennsäule befindet sich in einem thermostatisierten Ofen, welche während der Analyse nach einer temperaturprogrammierten Arbeitsweise eingestellt wird. Wichtige Parameter für die Einstellung sind:

Anfangstemperatur, Zeit, in der die Anfangstemperatur konstant gehalten wird, Steigungsrate in $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) und Endtemperatur.

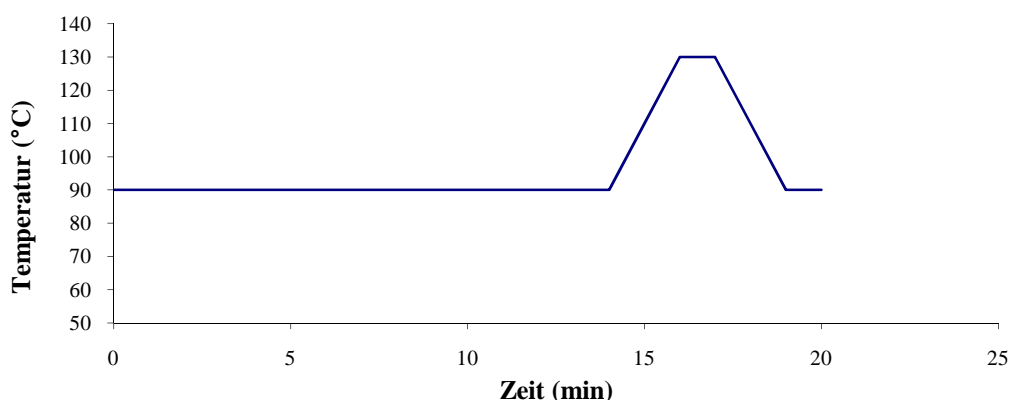


Abb.12 Die Matrix-Programmierung in der Gaschromatographie.

Die in der Säule getrennten einzelnen Komponenten treten mit dem Trägergas am Säulende aus und werden durch kontinuierliches Aufzeichnen von physikalischen oder chemischen Eigenschaften des Effluents detektiert. Der Flammenionisationsdetektor (FID) ist der verbreitete Detektor in der GC. Das aus der Säule austretende Gas wird mit Wasserstoff gemischt und gelangt durch eine Düse in eine Zelle, durch die Luft hindurchströmt. Dabei wird der Wasserstoff entzündet. Sollte eine Substanz in die Flamme gelangen, so wird sie verbrannt. Eine sehr geringe Menge (0,001 %) der Kohlenstoffatome unterliegt während des Verbrennungsprozesses einer Ionisierung. Eine in Bezug auf die Düse polarisierte Elektrode sammelt diese Ionen.

4.4 Spektralphotometrie

Im sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich absorbieren viele Stoffe das Licht, dies kann zur Konzentrations- bzw. Enzym-Aktivitätsbestimmung eingesetzt werden. Das Ausmaß der Absorption hängt sowohl von der Art und Konzentration des Stoffes, als auch von der Wellenlänge des verwendeten Lichts ab. Daher wird monochromatisches Licht verwendet. Das Prinzip beruht auf der Messung der Abschwächung der Intensität eines einfallenden Lichtbündels durch die in der Messzelle enthaltene Substanz.

Absorption $A = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = \epsilon \cdot c \cdot d$ Lambert-Beer'sches Gesetz

$$\frac{\Delta A}{\epsilon} = \Delta c ; \quad \frac{\Delta A}{\Delta t - \epsilon} = \frac{\Delta c}{\Delta t} = \nu ; \quad \nu = \text{Aktivität}$$

Das Absorptionsgesetz für Licht lautet in der differentiellen Schreibweise:

$$d\left(\frac{I}{I_0}\right) = -k \cdot dl \quad (4.1)$$

Anschaulich bedeutet dies, dass die relative Intensitätsabnahme $d\left(\frac{I}{I_0}\right)$ bei kleinen Wegstrecken der Dicke dl proportional ist.

Durch Integration der Gleichung (4.1) erhält man die Intensität I des Lichts nach Durchlaufen der Strecke l im absorbierenden Medium (Lambertsches Absorptionsgesetz):

$$I = I_0 e^{-kl} \quad (4.2)$$

Zur Auswertung von Messungen empfiehlt sich die logarithmische Schreibweise:

$$\ln\left(\frac{I}{I_0}\right) = -kl \quad \text{bzw.} \quad \ln I = -kl + \text{const.} \quad (4.3)$$

$$\text{mit } \text{const.} = \ln I_0.$$

Trägt man I gegen l auf halblogarithmischem Papier auf, so ergibt sich eine Gerade. In der Praxis verwendet man dekadische Logarithmen. Gleichung (4.3) hat dann die Gestalt

$$\log I = -k'l + \text{const}' \quad \text{mit } k' = \log e \cdot k = 0,434 \cdot k. \quad (4.4)$$

Für verdünnte Lösungen gilt im Allgemeinen, dass die Absorptionskonstante k' der Konzentration c proportional ist (Beersches Gesetz):

$$k' = \epsilon c. \quad (4.5)$$

Man nennt ϵ den molaren Extinktionskoeffizienten oder kurz Molarextinktion, wobei c in mol/l oder mol/cm³ anzugeben ist. Nach dem Beerschen Gesetz ist ϵ von der Konzentration c der Lösung unabhängig, d.h. ϵ ist eine Stoffkonstante.

Bei hohen Konzentrationen können Abweichungen vom Beerschen Gesetz auftreten.

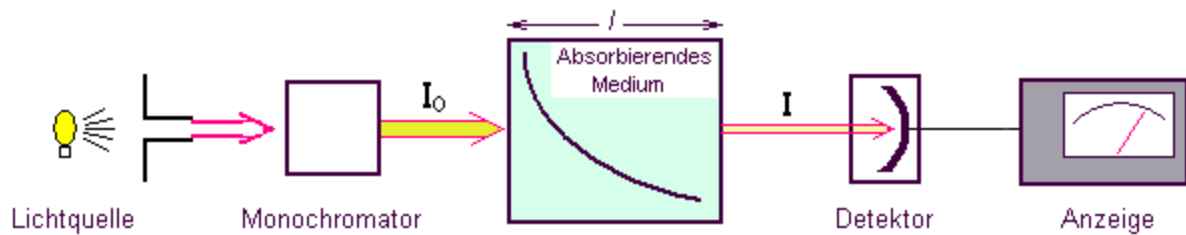


Abb. 13 Hauptbestandteile eines spektralphotometrischen Systems.

Abbildung 13 zeigt Hauptbestandteile eines spektralphotometrischen Systems. Monochromatisches Licht der Intensität I_0 durchstrahlt eine Küvette, in der sich die Lösung des absorbierenden Stoffes befindet. Die Intensität I des austretenden, abgeschwächten Lichts wird durch einen Detektor gemessen. Die Absorption (A) einer Lösung (oft auch als Extinktion bezeichnet) ist definiert als negativer Logarithmus des Quotienten (I / I_0). Das Lambert-Beer'sche Gesetz besagt, dass die Absorption der Konzentration (c) des absorbierenden Stoffes und der Schichtdicke der Lösung proportional ist. Zur Enzym-Aktivitätsbestimmung wird zunächst eine Lösung der beiden Reaktionspartner in eine Küvette gegeben und die Absorption bei einer stoffspezifischen, konstanten Wellenlänge (bei der zwar das Produkt adsorbiert, nicht aber die Ausgangsstoffe) registriert. Die unkatalysierte Reaktion ist meist sehr langsam. Deshalb werden erst nach Zugabe des katalysierenden Enzyms messbare Mengen an detektierbarem Produkt gebildet, die Absorption steigt an. Da die Absorptionszunahme $\Delta A / \Delta t$ nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz proportional zu $\Delta c / \Delta t$ ist, kann mit Hilfe des Absorptionskoeffizienten ε bei der gleichen Wellenlänge oder durch Vergleich mit Standardlösungen die Enzym-Aktivität bestimmt werden.

5 Experimenteller Teil

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Parametereinschätzungsfehler des Michaelis-Menten-Enzymskinetischen Prozesses genauer zu untersuchen und analytisch das Suchgebiet von kinetischen Parametern zu reduzieren.

5.1 Experimente zur Veresterung von IPG mit Vinylacetat

Die Umesterung des Isopropyliden-Glycerins (IPG) mit Vinylacetat als ein Acyl-Spender [Lundh-1995, Secundo-1997, Zanoni-2001] in Hexan [Bornscheuer-1994, Tservistas-1997, Capewell-1996] ist in Abbildung 1 dargestellt. In diesem Abschnitt wurde der Einfluss der Temperatur und der Enzymmenge auf die Enantioselektivität von *B.Cepacia Lipase* für D, L-IPG untersucht. Die katalytische Umsetzung wurde dabei mittels Gaschromatographie verfolgt.

5.1.1 Kalibrationsgerade für Gaschromatographie

Um die Fläche der Gaschromatographiepeaks mit der Konzentration der Lösung vergleichen zu können, wurden zunächst Kalibrationsgeraden für D-IPG erstellt. Mit Hexan wurde eine 1 mol/L Stammlösung von D-IPG vorbereitet. Von dieser Stammlösung wurden ein 1-100 mmol/L und ein 50-750 mmol/L D-IPG-Lösung mit Hexan verdünnt. Höhere Konzentrationen (50-750 mmol/L) wurden 20fach und niedrige Konzentrationen 10fach mit Hexan verdünnt und je 1 µl Probe wurde in den Gaschromatographen injiziert. Das Verhältnis der Peakflächen wird gegen die eingesetzte Probenkonzentration aufgetragen (Abb. 14 und 15).

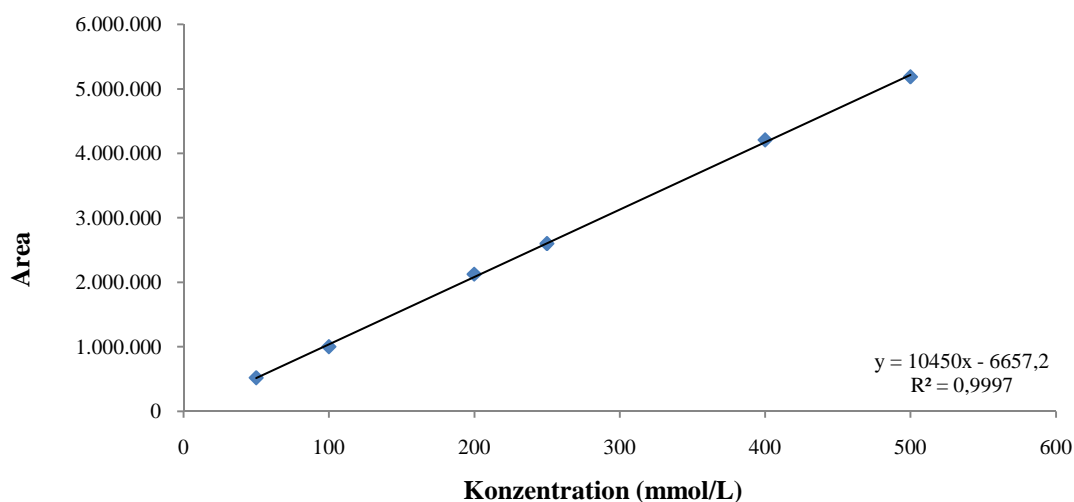


Abb. 14 Kalibrationsgerade der 50-750 mmol/L D-IPG-Konzentration. (20fache Verdünnung).

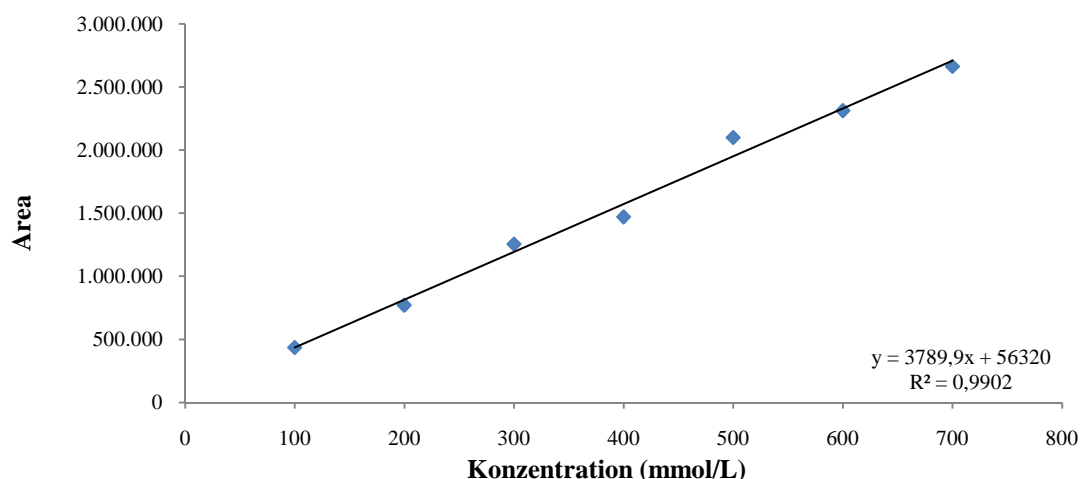


Abb. 15 Kalibrationsgerade der 5-100 mmol/L D-IPG-Konzentration. (10fache Verdünnung).

5.2 Charakterisierung der Enzymatischen IPG-Umsetzung

5.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Enantioselektivität von *B.Cepacia Lipase* .

Bei der Esterifizierung des Isopropyliden-Glycerins mit Vinylacetat wurde zunächst untersucht, inwieweit eine Veränderung der Temperatur die Reaktion beschleunigt, verlangsamt oder welchen Einfluss sie auf die Enantioselektivität hat. Wichtig ist hierbei, dass ein hoher Produktenantiomerenüberschuss (eeP) und besonders eine hohe Enantioselektivität erreicht werden.

Die Temperatur ist ein leicht kontrollierbarer Parameter unter den experimentellen Bedingungen und ein potenzieller Faktor, der die Enantioselektivität der enzymatischen Reaktionen beeinflussen kann [Miyavaza-1997, Miyavaza-1998]. Jedoch ist seine Wirkung auf die Stereoselektivität von enzymatischen Transformationen nicht genügend untersucht worden [Holmberg-1991, Miyazawa-1999, Yasufuku-1995]. In der Literatur sind bemerkenswert wenige systematische Studien über den Effekt der Temperaturschwankung auf die Stereochemie von enzymatischen Reaktionen beschrieben [Phillips-1996]. Es gibt einige Beispiele bei denen eine Verbesserung der Enantioselektivität durch die temperaturabhängige Umkehrung der Stereochemie beobachtet wurde [Bornscheuer-1991, Parmar-1992, Pham-1990].

Die Eyring-Übergangszustandtheorie [Eyring-1935] definiert die Beziehung der Temperatur mit der Reaktionsrate unveränderlich als:

$$k = \kappa \frac{k_B T}{h} K \quad (5.1)$$

Die Gleichgewichtskonstante ist mit der freien Gibbs-Energie und der Van't Hoff'schen Gleichung verbunden

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (5.2)$$

Die enzymatische Enantioselektivität (E) wird als das Verhältnis der beiden Genauigkeitskonstanten des konkurrierenden Enantiomers definiert [Straathof-1997].

Die unveränderliche Genauigkeit eines Enzyms für seine Substrate wird als das Verhältnis k_{cat}/K für das D- und L-Racemat beschrieben [Pham-1990, Orrenius-1998].

$$E = \frac{D}{L} = (k_{cat}/K)_D / (k_{cat}/K)_L \quad (5.3)$$

Wie in der folgenden Gleichung gezeigt, ist die kinetische Konstante k_{cat}/K mit der thermodynamischen Größe ΔG verbunden [Sih-1984],

$$\Delta \Delta G^* = -RT \ln E \quad (5.4)$$

wobei $\Delta \Delta G^*$ der Unterschied der freien Aktivierungsenergie zwischen dem D und L Enantiomer ist. [Pham-1990].

Die Temperaturabhängigkeit der Aktivierungsenergie wird durch die Gibbs-Helmholtz Gleichung gegeben.

$$\Delta \Delta G^* = \Delta \Delta H^* - T \Delta \Delta S^* \quad (5.5)$$

Das Einsetzen der Gleichung (5. 4) in die Gleichung. (5. 5), ergibt die Beziehung zwischen der Enantioselektivität, Enthalpie und Temperatur (Phillips-1996).

$$\ln E = \left(\frac{\Delta \Delta S^*}{R} \right) - \left(\frac{\Delta \Delta H^*}{RT} \right) \quad (5.6)$$

Wenn kein enantiomerisches Urteilsvermögen des Enzyms zwischen dem D und L Isomer vorkommt, folgt für $E = 1$ und $\Delta \Delta G^* = 0$.

In diesem Fall sind die Enthalpie und Temperatur-Beiträge gleich.

$$T_r = \Delta \Delta H^* / \Delta S^* \quad (5.7)$$

Bei Temperaturen unter T_r [racemische Temperatur] wird $\Delta \Delta G^*$ durch $\Delta \Delta H^*$ beherrscht und der E-Wert des Produktes wird bei Temperaturzunahme abnehmen, bis er bei T_r eins reicht.

Im Gegensatz dazu wird bei Temperaturen über T_r $\Delta \Delta G^*$ durch $T \Delta \Delta S$ und die E-Wertzunahmen von der Temperaturzunahme beherrscht.

Deshalb kann die Optimierung katalysierter Reaktionen entweder eine Anhebung oder das Senken der Reaktionstemperatur verlangen [Phillips-1992,-1996].

Die Identifizierung von $\Delta \Delta G_{D,L}$, das das enantiomerische Verhältnis bestimmt, öffnet die Möglichkeit E vorauszusagen [Overbeeke-1998]. Studien über die Temperaturabhängigkeit von E erlauben eine thermodynamische Analyse der Enantioselektivität von Enzymen, welche durch enthalpische und entropische Aktivierungsenergieunterschiede des Enantiomeren

verursacht wird. Diese Studien haben auch gezeigt, dass die entropischen Beiträge ungefähr so groß sind wie die enthalpischen Beiträge. Die entropische Aktivierungsenergie von den Wechselwirkungen mit lösenden Molekülen und Enantiomere im Übergangszustand an der aktiven Seite abhängt [Orrenius-1998, Ottosson-2002-01]. Obwohl das eine Zweiteilung zwischen Enthalpie und Entropie ist, die aus der beobachteten Temperaturabhängigkeit resultiert [Pham-1989], sind die enthalpischen und entropischen Bestandteile der differenzialaktivierungsfreien Energie $\Delta\Delta G_{L,D}$ beiderseits wichtig für den Gesamterfolg der kinetischen (Auflösung) Entschlossenheit des Enantiomers [Ottosson-2002].

Ebenso führt eine Erhöhung der Temperatur gewöhnlich zu einer Verminderung der Enantioselektivität. Eine hohe Enantioselektivität kann sogar bei hohen Temperaturen erwartet werden, wenn die Struktur des Substrats vom mechanistischen Gesichtspunkt ideal ist [Ema-2004].

Der Acylspender kann die Enantioselektivität und Reaktionsrate der Acylation im großen Maße beeinflussen [Miyazawa-1992]. Eine geringe Verlängerung der Alkylkette des Vinylesters verursachte starke Änderungen in der Enantioselektivität [Ema-1996].

Die Selektivität war am höchsten als Vinylacetat als Acylspender verwendet wurde und wurde niedriger mit der Kettenlänge der Fettsäure [Miyawaza-1998]. Die Position der Doppelbindung beeinflusste ebenfalls die Reaktionsrate und die Enantioselektivität [Irimescu-2004]. Die umfangreiche aromatische Gruppe erlaubte nur einem Enantiomer sich auf der aktiven Seite einzufügen, wohingegen für aliphatische Komponenten das Enzym zwischen den beiden Formen nicht unterscheiden konnte [Bornscheuer-1995]. Die Zugabe entsprechender Wassermenge kann drastisch das Verhalten der Enantioselektivität als Funktion der Temperatur verändern [Yasufuku-1995]. Wie in der Tabelle 3 zusammengefasst, ändert sich der Enantioselektivität -Wert mit der Temperatur.

Temperatur	Enantioselektivität	Literatur
hoch	hoch	Yasufuku – 1996, Yasufuku – 1997
hoch	niedrig	Ema – 2004, Ema – 2003, Sakai – 1997, Sakai – 1998, Sakai – 2003, Yang – 1997, Parmar -1992
niedrig	hoch	Sakai –2004, Sakai –2004 – 01, Majumder – 2007,
low	niedrig	Boutelje – 1988
hoch oder niedrig	keine Veränderung	Barton – 1990, Monterde – 2002, Cipiciani – 2001

Tabelle 3 Forschung über die Änderung der Enantioselektivität Temperatur.

Die nicht-kovalenten Wechselwirkungen des Substrats mit den Rückständen an der aktiven Seite des Enzyms bestimmen die thermodynamischen und kinetischen Eigenschaften des Komplexes

[Lin-2006]. Über die erwähnte Gleichung 5. 4 hinaus, gibt es die Beziehung zwischen der Enantioselektivität und Temperatur über die freie Aktivierungsenergie $\Delta\Delta G$. Die Gleichungen 5.5 und 5.6 stellen ein Verhältnis der freien Energie mit den Enthalpie- und Entropiebeiträgen dar.

Wenn der $\Delta\Delta G$ durch den $T\Delta\Delta S$ -Term beherrscht wird, werden die Reaktionen das maximale stereochemische Urteilsvermögen bei der höchsten Temperatur vereinbar mit der Stabilität des Enzyms - cofactor - Substrat-System aufzeigen.

Wenn der Substituent polare Gruppen hat, die mit dem Enzym durch die ionische Anziehungskraft oder durch das Wasserstoffbrückenbindungen aufeinander wirken, wird der $\Delta\Delta H$ Term ziemlich groß und beherrscht die freie Aktivierungsenergie, welches auf eine geringe oder keine Wirkung der Temperatur hinausläuft.

Wenn der Hauptmitwirkende zu $\Delta\Delta G$ $\Delta\Delta H$ ist, dann wird die stereochemische Reinheit des Reaktionsproduktes bei der niedrigsten Temperatur maximal sein, bei der das Enzym eine hohe Reaktionsrate aufzeigt [Phillips-1996].

In dieser Arbeit stellte sich heraus, dass die Enantioselektivität von der Änderung der Reaktionstemperatur nicht beeinflusst wird.

Die Reaktionsrate der Umesterung von IPG war hoch wobei keine bestimmte erkennbare Veränderung der Enantioselektivität zwischen den D, L Racematen beobachtet werden konnte. Der Effekt der Temperatur auf die Reaktionsrate verringert nur den Zeitverlauf der Reaktion, welches auf eine hohe Konvertierung hinausläuft.

Dies ist mit der Literatur übereinstimmend, wo unterschiedliche Wirkungen der Temperatur auf die Enantioselektivität beobachtet wurde.

Wie Philips den intermolekularen Beitrag der molekularen Struktur beschreibt, hat die Entropie durchgehend keinen Effekt in dieser Reaktion.

Der Enthalpieterm ist verhältnismäßig sehr groß, womit $T\Delta\Delta S$ vernachlässigbar ist. Die Enantioselektivität der IPG Reaktion kann mit der Temperaturänderung nicht beeinflusst werden. Stattdessen können der unterschiedliche Acylspender, das Lösungsmittel und die beigemischte Wassermenge untersucht werden, um deren Entropieeffekt auf die gewünschte Trennung der Racemate zu erkennen.

5.2.1.1 Esterifizierung des Isopropyliden-Glycerins bei unterschiedlichen Temperaturen

Der Umsatz und die Selektivität der Esterifizierung von IPG wurde in Abhängigkeit von der Temperatur untersucht. Hierbei wurden die vom Hersteller des Enzyms vorgegebenen Temperaturangaben (Temperaturoptimum 50 °C, Fluka 2004) berücksichtigt und Temperaturen von 35 °C, 40 °C, 45 °C, 50 °C und 55 °C gewählt.

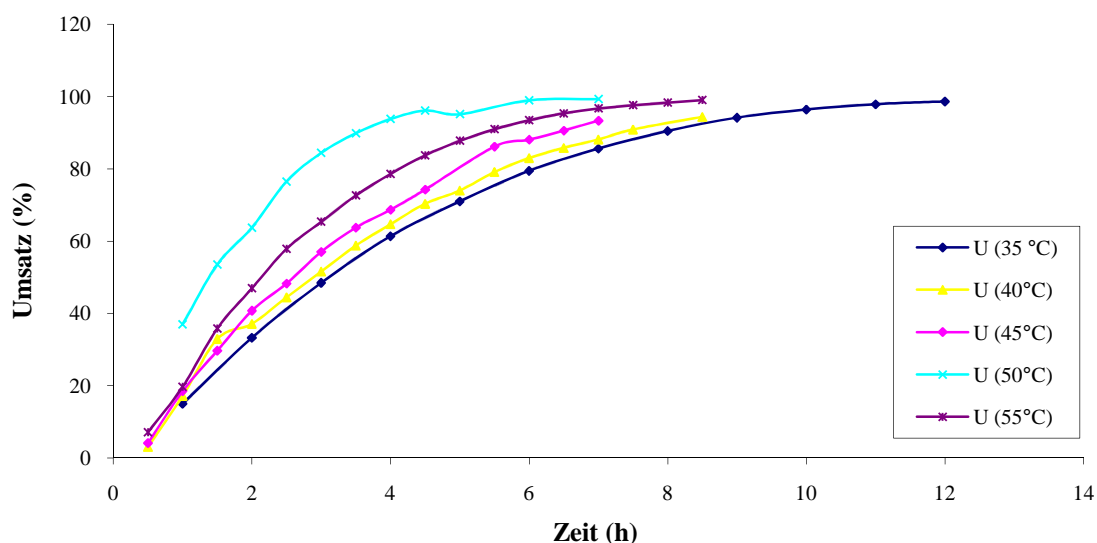


Abb. 16 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von IPG bei verschiedenen Temperaturen.

Im Verlauf der Reaktionszeit (Abb. 16) steigt der Umsatz mit der Temperatur an. Auffällig wird hierbei insbesondere der verstärkte Umsatz bei 50 °C. Während zwischen den Umsätzen bei 35 °C (von 15 % auf 61 % in vier Stunden), bei 40 °C (von 17 % auf 64,67 % in vier Stunden) und bei 45 °C (von 18 % auf 68,68 % in vier Stunden) kaum Unterschiede zu erkennen sind, ist die Zunahme des Umsatzes bei 55 °C und 50 °C sehr groß. Hier steigen die Umsätze in den ersten vier Stunden bei 55 °C von 7,1 % auf 78,65 % und bei 50 °C von 36,99 % auf 93 %.

Das enantiomerische Verhältnis wurde gemäß Rakels mit der folgenden Gleichung bestimmt.

$$E = \frac{\ln \left[\frac{1-eeS}{1+\left(\frac{eeS}{eeP}\right)} \right]}{\ln \left[\frac{1+eeS}{1+\left(\frac{eeS}{eeP}\right)} \right]} \quad (5.8)$$

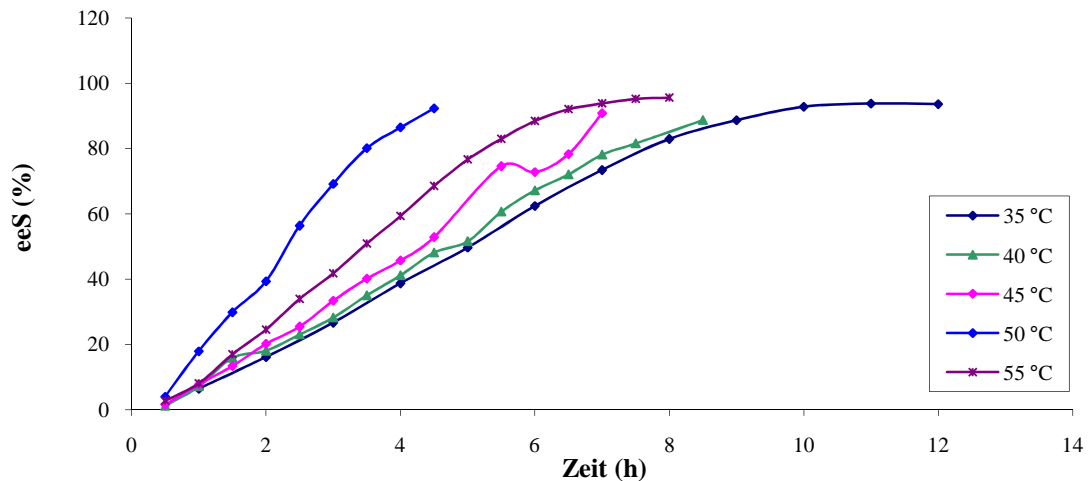


Abb. 17 Zeitlicher Verlauf des Substratanantiomerenüberschusses (eeS) von IPG bei verschiedenen Temperaturen.

Der Umsatz und Substratanantiomerenüberschuss (eeS) zeigt ähnliche Verläufe. Der eeS steigt bei einer Temperatur von 35 °C in vier Stunden von 5,63% auf 38,68 %, bei 40 °C von 1,56% auf 45,65% und bei 45°C von 1,5 auf 41,13 % an. Bei 50°C und 55°C ist ein stärkerer Anstieg von eeS zu erkennen. Bei 50 °C steigt der eeS von 3,95 % auf 86 % und bei 55 °C von 2,4 auf 59 % an. Diese Diskrepanz zwischen der tiefsten und höchsten Temperatur ist hierbei genauso auffällig wie bei dem Umsatz.

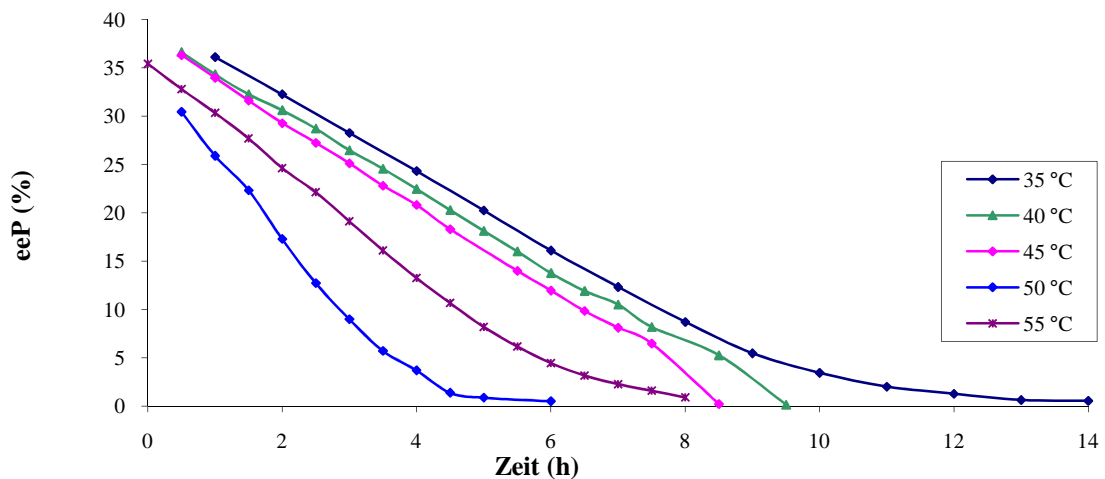


Abb. 18 Zeitlicher Verlauf des (eeP) von IPG. bei verschiedenen Temperaturen.

Der Produktenantiomerenüberschusses (eeP, Abb.18) fällt bei 50 °C in fünf Stunden von 30,46 % auf 0,86 % rapide ab. Im gleichen Zeitraum sinkt die eeP bei 55 °C von 32,81 auf 8,19 % und in acht Stunden auf 0,88 % ab. Die eeP bleiben für 35 °C, 40 °C und 45 °C relativ konstant und unterscheiden sich kaum.

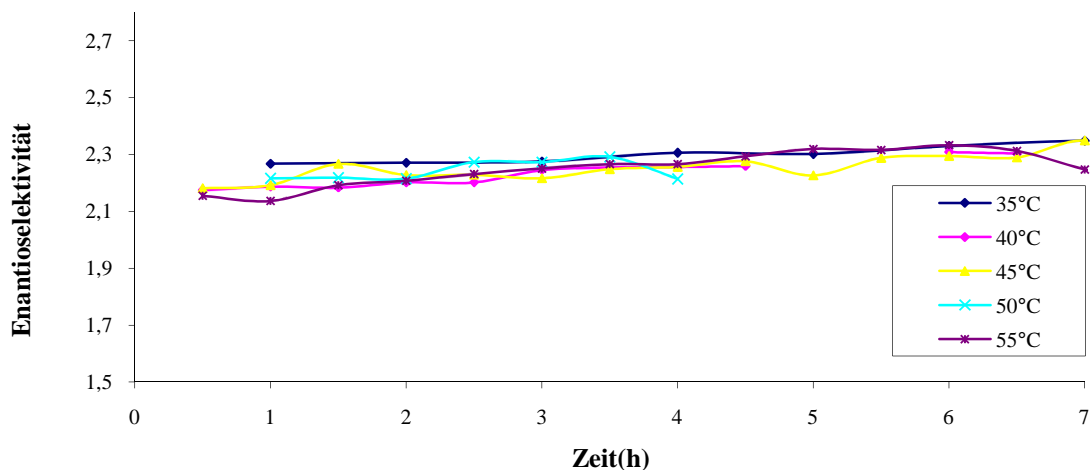


Abb. 19 Zeitlicher Verlauf der Enantioselektivitäten bei verschiedenen Temperaturen.

In der obigen Abbildung (Abb. 19) wird die Enantioselektivität in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt. Es bestehen keine großen Unterschiede zwischen den Enantioselektivitäten. Wird der Mittelwert von jeder Temperatur berechnet, so wird ersichtlich, dass die mittlere Enantioselektivität 2,2645 ist.

Der Einfluss der Reaktionstemperatur auf die Enantioselektivität scheint von der Natur der Reaktion abzuhängen [Monterde 2002]. Eine Erhöhung der Temperatur führt normalerweise zu einer Zunahme der enzymatischen Reaktionsrate und einer höheren Endkonvertierung [Bornscheuer - 1991]. Zur gleichen Zeit nimmt die Enantioselektivität häufig ab, wobei ein Verlust der Enzym-Stabilität beobachtet werden kann [Lokotsch - 1989].

Die Geschwindigkeit einer chemischen Reaktion nimmt mit steigender Temperatur zu. Es gilt die von Van't Hoff aufgestellte RTG-Regel, die bestimmt, dass die Reaktionsgeschwindigkeit um das zwei bis vierfache steigt, wenn die Reaktionstemperatur um etwa 10 °C erhöht wird. Wie aus den Ergebnissen ersichtlich wird, gilt die RTG-Regel nur für niedrige Temperaturen. Die Reaktionsgeschwindigkeit und gleichzeitig der Umsatz steigen mit zunehmender Temperatur an. Die Versuchstemperatur 50 °C stellt einen Wendepunkt dar, bei dem der Reaktionsumsatz wieder abfällt. Das kommt dadurch zustande, dass mit steigender Temperatur ab 50 °C die Enzymstruktur zerstört wird. Beim Erreichen der kritischen Temperatur geht die Tertiärstruktur und dadurch die biologische Aktivität des Proteins verloren. Diesen Vorgang bezeichnet man als Denaturierung.

5.2.2 Einfluss der Lipasekonzentration auf die enzymatischen Reaktionen

In diesem Kapitel wird der Einfluss der Lipasenmenge auf den Reaktionsablauf untersucht. Als Reaktionstemperatur wurden die optimale (50 °C) und niedrigste (35 °C) Temperatur vom Kapitel 5.2.1.1 gewählt.

Das Experiment wurde im Batchansatz bei verschiedenen Enzymmengen (25mg, 50mg, 75mg, 100 mg) durchgeführt. In einen 20 ml Glaskolben wurden 10 mmol IPG (Racemat) und 30 mmol Vinylacetat (Überschusskomponente) gefüllt. Das Gesamtvolumen betrug 10 ml, das Restvolumen wurde mit Hexan aufgefüllt. Die Reaktion beginnt, wenn die Lipase in der Lösung suspendiert wird.

5.2.2.1. Umsatz (U) und Selektivität bei 35 °C

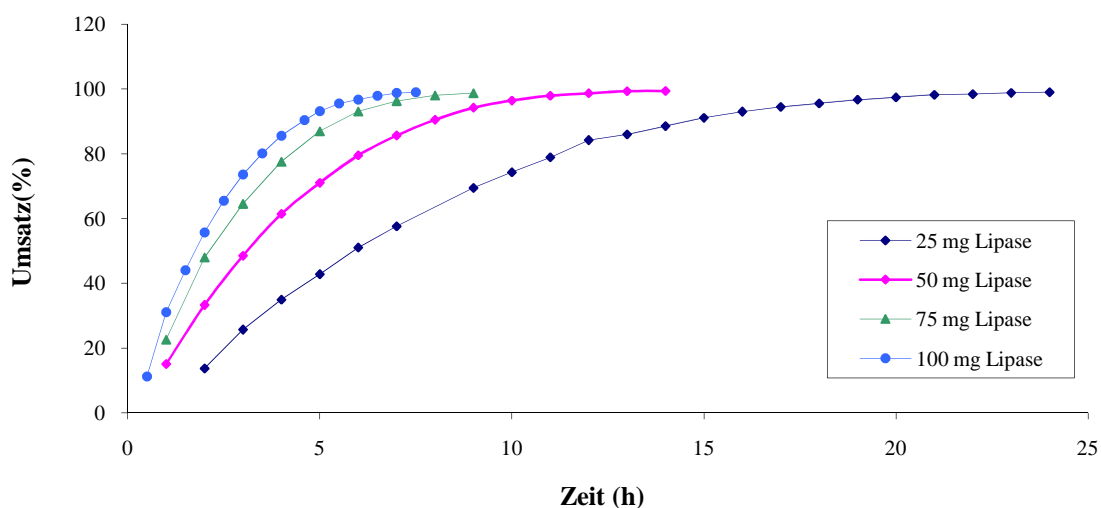


Abb. 20 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 35°C.

Mit der Lipasekonzentration steigt der Umsatz erheblich an. In sieben Stunden steigt der Umsatz mit 25 mg Lipase auf 57 %, mit 50 mg Lipase auf 85 %, mit 75 mg Lipase auf 96,3 % sowie mit 100 mg Lipase auf 98,79 % an.

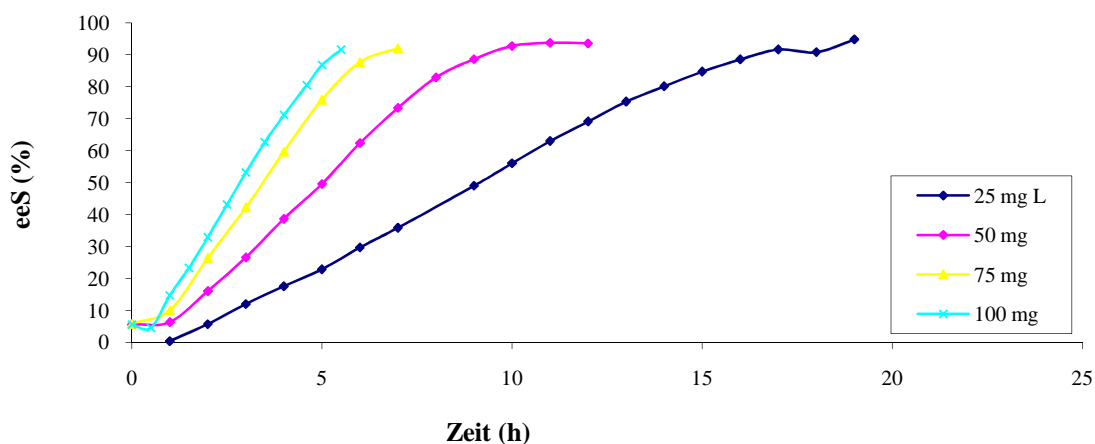


Abb. 21 Zeitlicher Verlauf des (eeS) von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 35 °C.

Der Substratanantiomerenüberschuss (eeS) steigt ebenfalls mit der Lipasekonzentration an. Bei 35 °C steigt eeS in fünf Stunden mit 25 mg Lipase auf 22,92 %, mit 50 mg Lipase auf 49,59 %, mit 75 mg Lipase auf 75,92 % und mit 100 mg Lipase auf 86,81 % an.

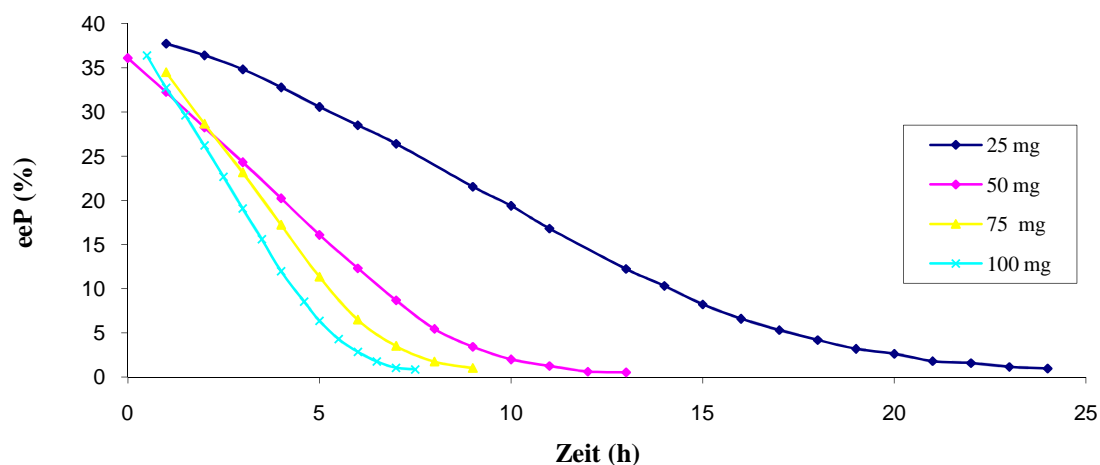


Abb. 22 Zeitlicher Verlauf des Enantiomerenüberschusses (eeP) von IPG bei 35 °C.

Der Produktenantiomerenüberschuss (eeP) fällt in sieben Stunden bei 100 mg Lipase rapide von 36,39 % auf 1,05 % ab. Im gleichen Zeitraum sinkt der eeP bei 75 mg Lipase von 34,5 % auf 3,5 % und bei 50 mg Lipase von 36 % auf 12 %. Mit 25 mg Lipase fällt die eeP innerhalb von sieben Stunden von 37 % auf 26 % und in 24 Stunden auf 0,97 % sehr langsam ab.

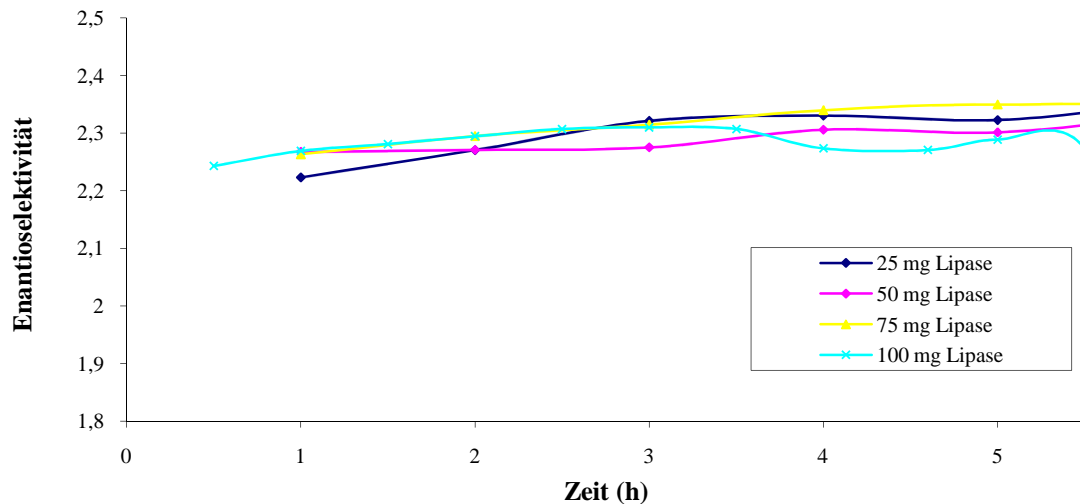


Abb. 23 Zeitlicher Verlauf der Enantioselektivitäten mit verschiedenen Lipasemengen bei 35°C.

In Abbildung 23 wird deutlich, dass die Enantioselektivität bei unterschiedlichen Lipasemengen kaum Änderungen zeigt. Nachdem die Mittelwerte der Enantioselektivität von jeder Lipasemenge berechnet werden, wird deutlich, dass der größte Wert mit 25 mg Lipase 2,338 beträgt; dann folgen mit 50 mg Lipase 2,3022, mit 75 mg Lipase 2,3 und mit 100 mg Lipase 2,284.

5.2.2.2 Umsatz (U) und Selektivität bei 50 °C

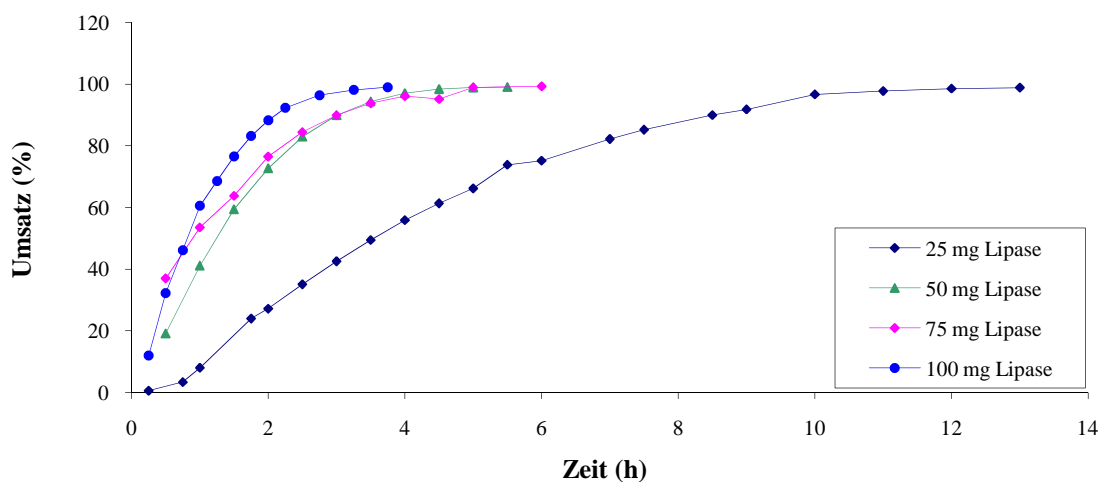


Abb.24 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 50 °C.

Auch bei 50 °C steigt der Umsatz mit steigender Enzymkonzentration an (Abb. 24). Auffällig wird hierbei der Umsatz bei 25 mg Lipase. In zehn Stunden konnte ein Umsatz von 96,66 % erreicht werden. Die Umsätze bei 50 mg (in 4,5 Stunden von 36 % auf 96 %), 75 mg (in 4,5 Stunden von 19 % auf 98 %) und bei 100 mg Lipase (in 3,5 Stunden von 11,2 % auf 99 %) zeigen keine großen Unterschiede.

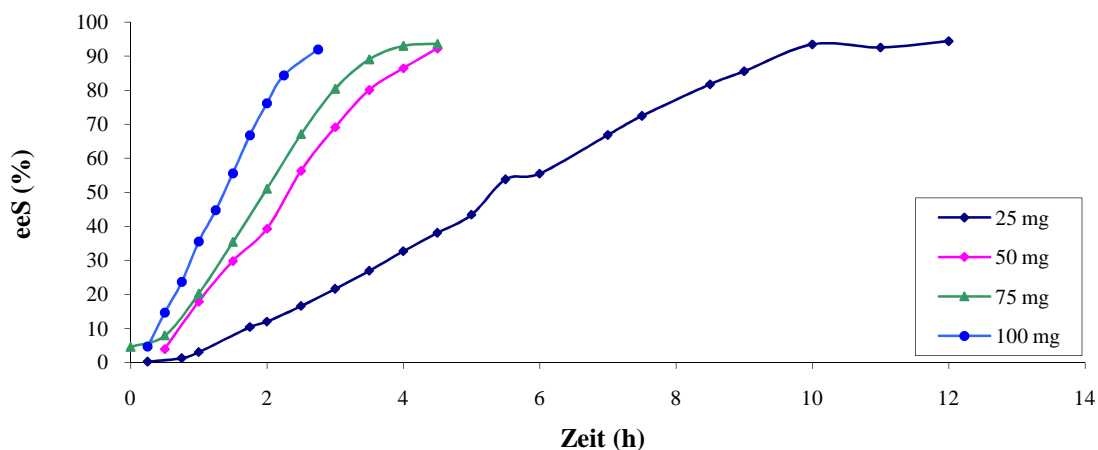


Abb. 25 Zeitlicher Verlauf des eeS von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 50 °C.

Der Substrantenantiomerenüberschuss (eeS, Abb. 25) steigt bei der Versuchstemperatur von 50 °C in 2,75 Stunden mit 100 mg Lipase auf 91,99 %, in vier Stunden mit 75 mg auf 93,04 %, in 4,5 Stunden mit 50 mg Lipase auf 92,26 % und in zehn Stunden mit 25 mg Lipase auf 22,92 % an.

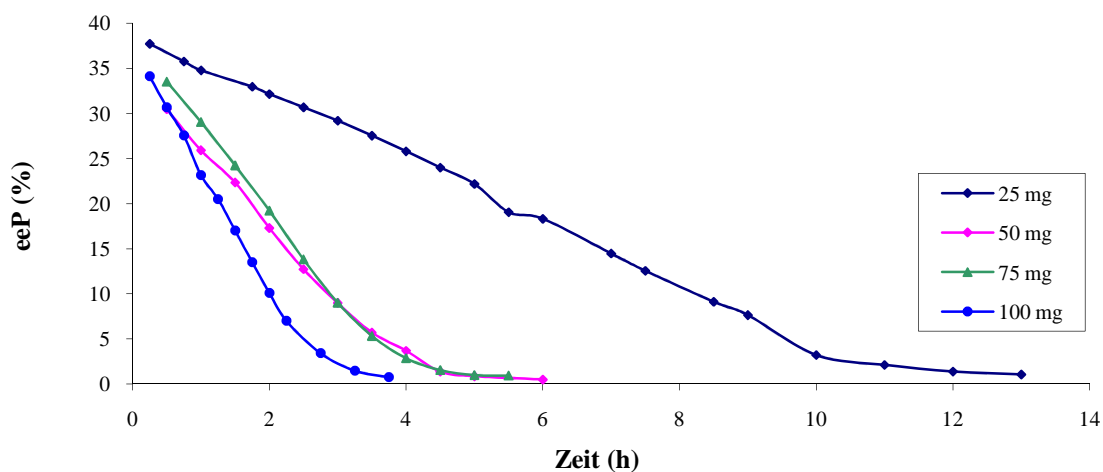


Abb. 26 Zeitlicher Verlauf des eeP von IPG mit verschiedenen Lipasemengen bei 50 °C.

In der Abbildung 26 fällt der eeP mit steigender Enzymkonzentration innerhalb kurzer Zeit ab. Auffallend ist hierbei der eeP-Verlauf bei 25 mg Lipase, in zwölf Stunden sinkt der eeP von 37,72 % auf 1,4 %. Die Differenzen in den eeP bei 50 mg (von 30,46 % auf 0,46 % in fünf Stunden), bei 75mg (von 33,52 % auf 1,4 % in 4,5 Stunden) und bei 100 mg Lipasen (von 34,11 % auf 0,77 % in 3,75 Stunden) sind deutlich geringer.

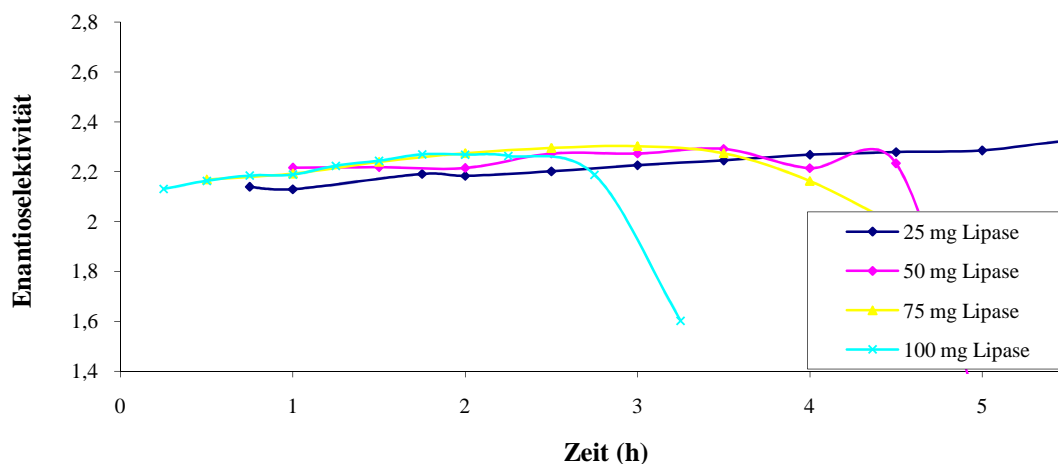


Abb. 27 Zeitlicher Verlauf der Enantioselektivitäten mit verschiedenen Temperaturen bei 50 °C.

In der obigen Abbildung 27 sind die Enantioselektivitätswerte bei unterschiedlichen Lipasemengen einander ähnlich. Die Mittelwerte der Enantioselektivitäten von jeder Lipasemenge betragen bei 25 mg Lipasemenge 2,259, bei 50 mg Lipasemenge 2,242, bei 75 mg Lipasemenge 2,238 und bei 100 mg Lipasemenge 2,212. Die Mittelwerte der Enantioselektivitäten betragen 2,2475.

Die Enzymkonzentration bestimmt zusammen mit der katalytischen Geschwindigkeitskonstante gemäß $v = k_2 ES$ (Gl. 3. 12) die Geschwindigkeit der Reaktion. Eine Variierung der Enzymkonzentration führt bei ausreichendem Substratüberschuss immer zu einer Änderung der Reaktionsgeschwindigkeit. Unter diesen Bedingungen liegt praktisch jedes Enzym als ES-Komplex vor und die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt sich nach Gleichung (3. 12) direkt aus der Enzymmenge.

5.2.3 Veresterung von L-IPG und D-IPG

In diesem Kapitel werden L- und D-IPG einzeln mit dem Vinylacetat in einer Reaktion eingesetzt, um das Verhalten des Enzyms auf die beiden Formen zu untersuchen. Als Reaktionstemperatur wurde 50 °C gewählt. 10 mmol L-IPG und D-IPG wurden mit 30 mmol Vinylacetat in einen 20 ml Glaskolben eingefüllt. Das Restvolumen der Reaktionslösung wurde mit Hexan auf 10 ml aufgefüllt und mit einem Magnetrührer vermischt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mg Lipase gestartet.

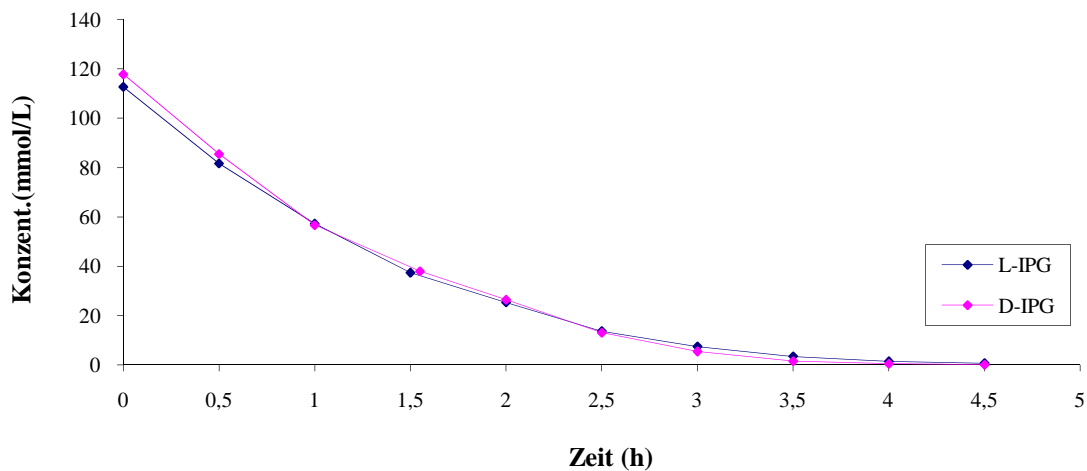


Abb. 28 Zeitlicher Konzentrationsverlauf von D- und L-IPG mit 50 mg Lipase bei 50 °C.

In der Abbildung 28 wird der Konzentrationsablauf von L- und D-IPG gegenübergestellt. Für beide Formen sind ähnliche Abnahmen zu erkennen, wenn sie getrennt mit dem Vinylacetat reagieren.

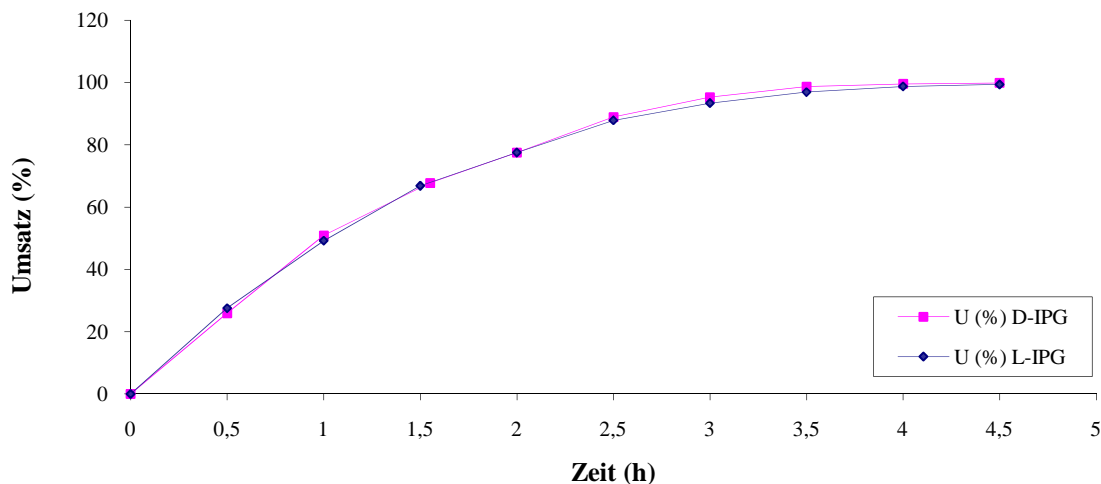


Abb. 29 Zeitlicher Umsatzverlauf von D- und L-IPG mit 50 mg Lipase bei 50 °C.

Das Umsatzverhalten ist für L- und D-IPG ebenfalls ähnlich. Es bestehen keine bemerkenswerten Unterschiede zwischen den beiden Formen, wenn sie einzeln mit der Lipase reagieren.

Um die v_{max} - und K_m -Werte zu errechnen wird die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung verwendet.

Aus der Steigung der Trendlinie und dem Achsenabschnitt werden die, v_{max} -und K_m -Werte ausgerechnet. (v_{max}^E =Maximale Reaktionsgeschwindigkeit pro Enzymkonzentration.)

	v_{max}	K_m
D-IPG	0,67 (mol/L*h)	0,285 (mol/L)
L-IPG	0,66 (mol/L*h)	0,98 (mol/L)

Tabelle 4 Zusammenstellung v_{max} und K_m von D- und L-IPG bei 50 °C

Aus Tabelle 4 wird ersichtlich, dass die v_{max} -Werte von D- und L-IPG fast identisch sind. Hingegen zeigen die K_m -Werte große Unterschiede. Diese Unterschiede kommen dadurch zustande, dass die K_m -Werte im Batch-Prozess einen größeren Spielraum haben, was in Kapitel 5.3 detailliert erklärt wird.

5.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Umesterung von IPG

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Umesterung des Isopropyliden-Glycerins (IPG) mit Vinylacetat und dabei die Wirkungen der Temperatur und Enzymkonzentration auf die Enantioselektivität von *Burkholderia cepacia* Lipase für D- und L-IPG untersucht.

Die Verbesserung der Enantioselektivität um mehr gewünschte Produkte zu erzeugen, wurde kürzlich von vielen Laboratorien erforscht. Um diese Verbesserung zu erreichen, wurden die physischen Zustände des Reaktionsmediums verändert. Der Acylspender, das Lösungsmittel, der Effekt des Wassergehalts auf die Enzymflexibilität und die Temperatur sind die allgemeinen untersuchten Parameter. Unter diesen Parametern stellte sich heraus, dass sich die Enantioselektivität unregelmäßig mit der Temperatur ändert, wie in der Literatur sowie in dieser Arbeit ermittelt. So kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die molekulare Struktur des Substrates indirekt die Abhängigkeit der Enantioselektivität von der Temperatur bestimmt, indem sie den Beitrag des enthalpischen oder entropischen Effektes der Aktivierungsenergie definiert.

In Kapitel 5.2.2 wurde deutlich, dass die Enzymkonzentration von 100 mg auf 25 mg, um 75 Prozent gesenkt werden kann. Dementsprechend langsamer verläuft auch die Reaktionsgeschwindigkeit. Die Enantioselektivität ändert sich nicht auffallend bei einer Variierung der Lipasemenge oder Temperatur.

5.3 Vergleich von Batch-und Fed-Batch-Prozess

Zur Bestimmung der Parameter v_{\max}^E und K_m wurde ein Batch-Prozess und ein Fed-Batch-Prozess (Puls-Experiment) durchgeführt, um nachzuweisen, dass der Fed-Batch-Prozess bessere Annäherungen als Batch-Prozess zeigt.

5.3.1 Veresterung von D-IPG im Batch Prozess

Als Reaktionstemperatur wurde 50 °C gewählt. Die Veresterung wurde mit 50 mg Lipase wie in Kapitel 4.1 beschrieben durchgeführt.

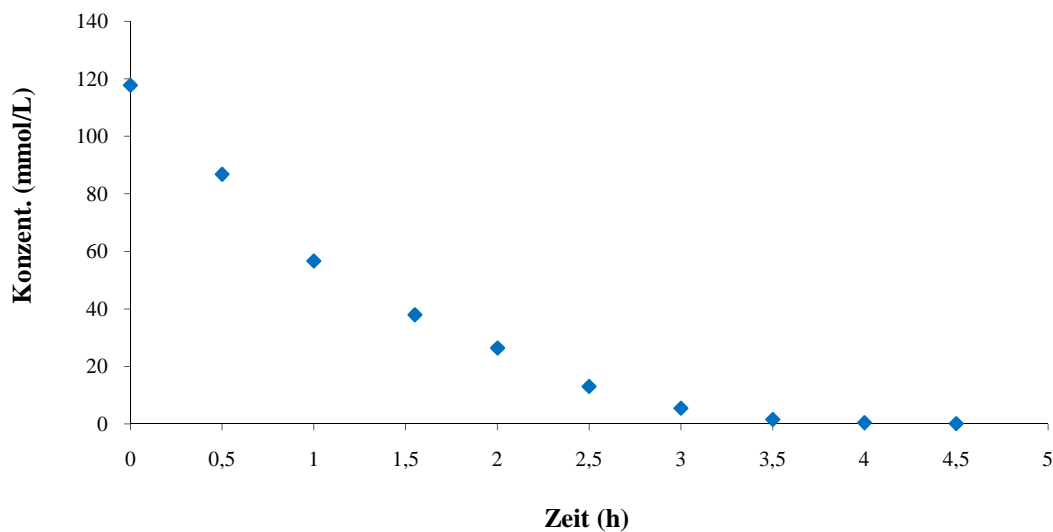


Abb. 30 Zeitlicher Verlauf der Konzentration von D-IPG mit 50 mg Lipase bei 50 °C.

5.3.1.1 Berechnung von v_{\max} und K_m im Batch-Prozess durch die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung.

Um die v_{\max} - und K_m -Werte zu errechnen wurde die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung (Kapitel 3.2) verwendet. Aus der Steigung der Trendlinie und dem Achsenabschnitt werden die v_{\max} -, v_{\max}^E - und K_m -Werte ausgerechnet.

(v_{\max}^E = Maximale Reaktionsgeschwindigkeit pro Enzymkonzentration.)

v_{\max}	v_{\max}^E	K_m
0,67738 mol/Lh	$0,677/5 = 0,135$ mol/Lh	0,285 mol/L

Tabelle 5 Werte von v_{\max} und K_m von D-IPG durch integrierte Michaelis-Menten-Gleichung bei 50 °C

5.3.1.2 Berechnung von v_{\max} und K_m im Batch-Prozess durch kleinste Fehlerquadrate.

Die Parameter v_{\max}^E und K_m von diesem Batch-Prozess wurde durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate von Herrn Prof. Dr. Bernd Hitzmann berechnet.

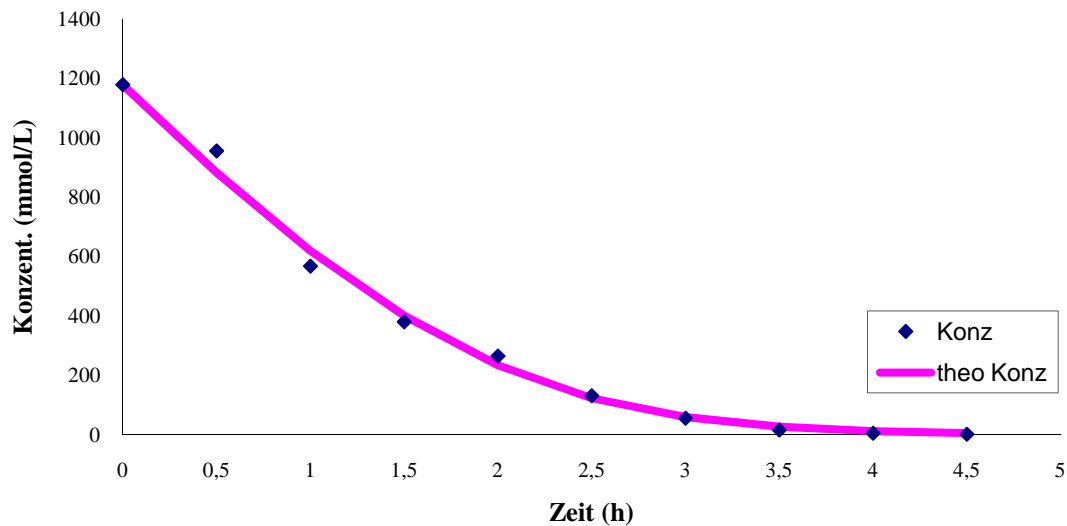


Abb. 31 Zeitlich idealer Verlauf der Konzentration von D-IPG mit 50 mg Lipase bei 50 °C.

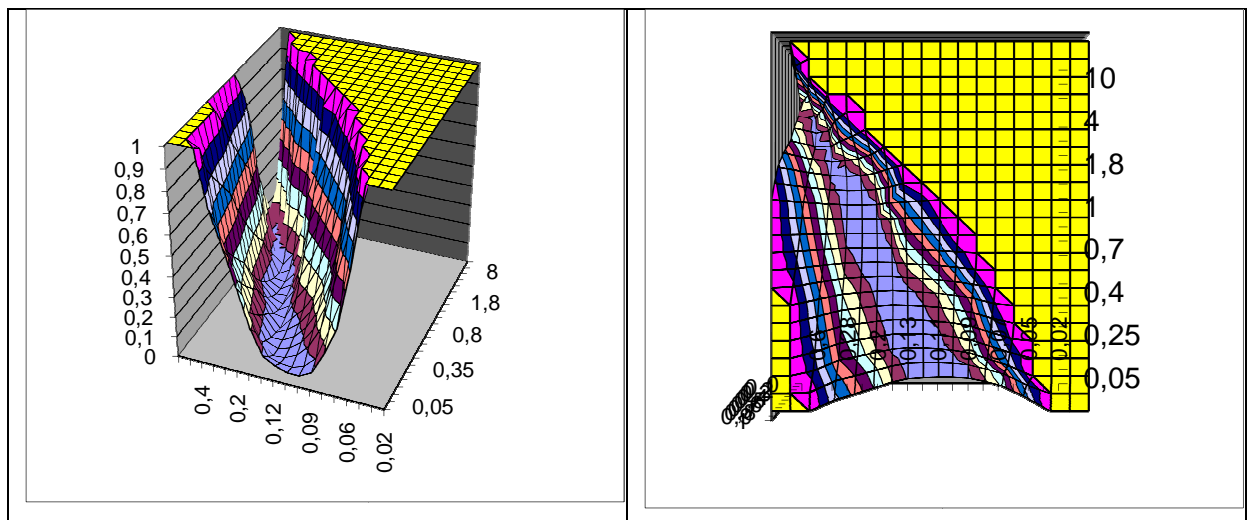


Abb. 32 3D Ansicht von v_{\max}^E , K_m und Fehler Rechnungen im Batch Prozess

v_{\max}	v_{\max}^E	K_m
0,9 mol/Lh	$0,9/5 = 0,18$ mol/Lh	0,53 mol/L

Tabelle 6 Werte von v_{\max} und K_m von D-IPG durch kleinste Fehlerquadrate bei 50 °C.

5.3.2 Veresterung von D-IPG im Fed Batch Prozess

Die Reaktion beginnt in einem Glaskolben mit einem Volumen von 20 ml. Das Reaktionsvolumen beträgt am Anfang der Reaktion 2,5 ml. Diese Mischung, die mit einem Magnetrührer gerührt wird, enthält 5 mmol D-IPG und 15 mmol Vinylacetat. Als Reaktionstemperatur wird wieder 50 °C gewählt.

Die Reaktion fängt an, wenn 50 mg Lipase in der Reaktionslösung suspendiert ist.

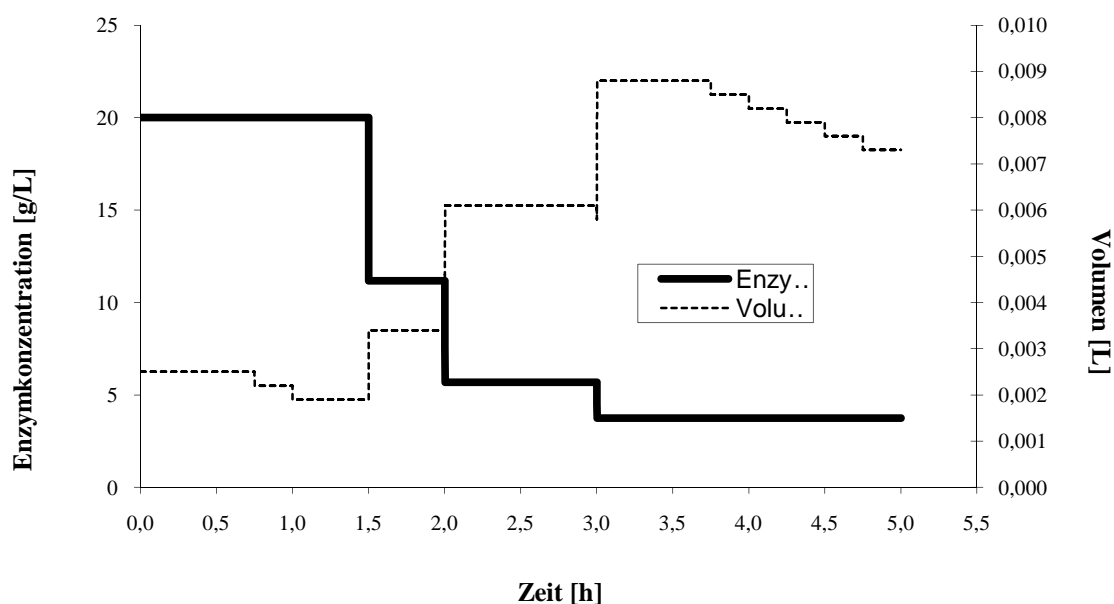


Abb. 33 Zeitlicher Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens beim Puls-Experiment.

In Abbildung 34 werden der zeitliche Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens dargestellt. Mit jedem Puls nimmt die Enzymkonzentration ab und das Reaktionsvolumen zu. Durch die Probenahme verringert sich das Reaktionsvolumen, die Enzymkonzentration bleibt jedoch konstant.

Nach 0,75 h, 1 h, 2 h, 3 h, 3,75 h, 4 h, 4,25 h, 4,5 h, 4,75 h und 5 h wurde 300 µl große Probe entnommen. Die Reaktion in der Probe wurde durch Abzentrifugieren der Lipase gestoppt. Nach 1,5 h wurde der Reaktionsmischung eine 1,5 ml Lösung aus 0,67 mmol D-IPG und 2,0 mmol Vinylacetat, als erster Puls, hinzugefügt. Der zweite und dritte Puls folgte nach zwei bzw. drei Stunden direkt nach der Probenahme. Hier wurde darauf geachtet, dass der zweite und dritte Puls gleich nach den Probenahmen dem Reaktionskolben zugegeben wurden. Das Volumen der beiden Pulse, zwei und drei, betrug 3 ml aus 0,67 mmol D-IPG und 2,0 mmol Vinylacetat.

Die nach der fünfstündigen Versuchsdurchführung erhaltenen zehn Proben wurden gaschromatographisch analysiert. In Abbildung 35 ist der zeitliche Konzentrationsverlauf vom D-IPG des Puls-Experiments grafisch dargestellt.

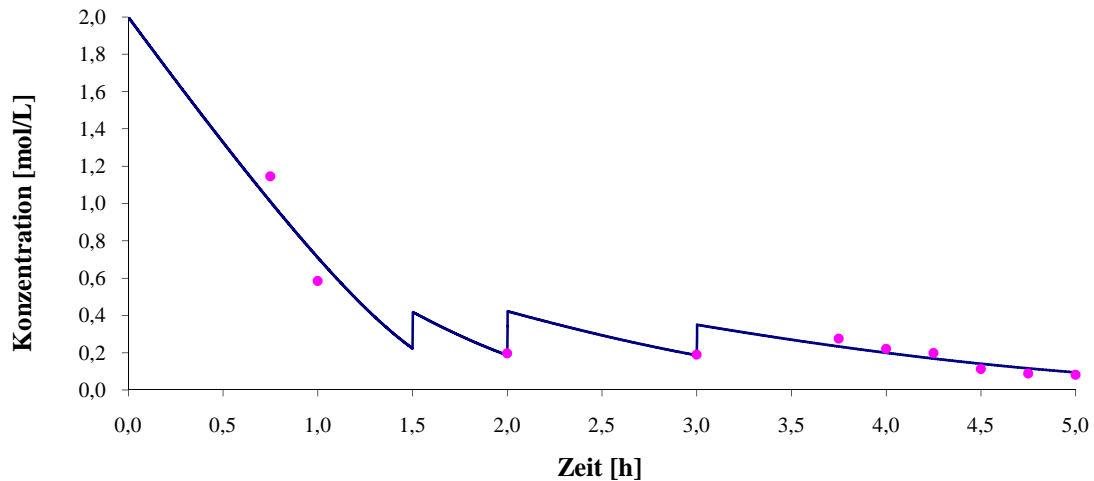


Abb. 34 Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom D-IPG beim Fed-Batch-Prozess (Puls-Experiment).

5.3.2.1 Berechnung von v_{max} und K_m im Fed-Batch-Prozess durch kleinste Fehlerquadrate.

Der Parameter v_{max}^E und K_m von diesem Fed-Batch-Prozess wurde durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet.

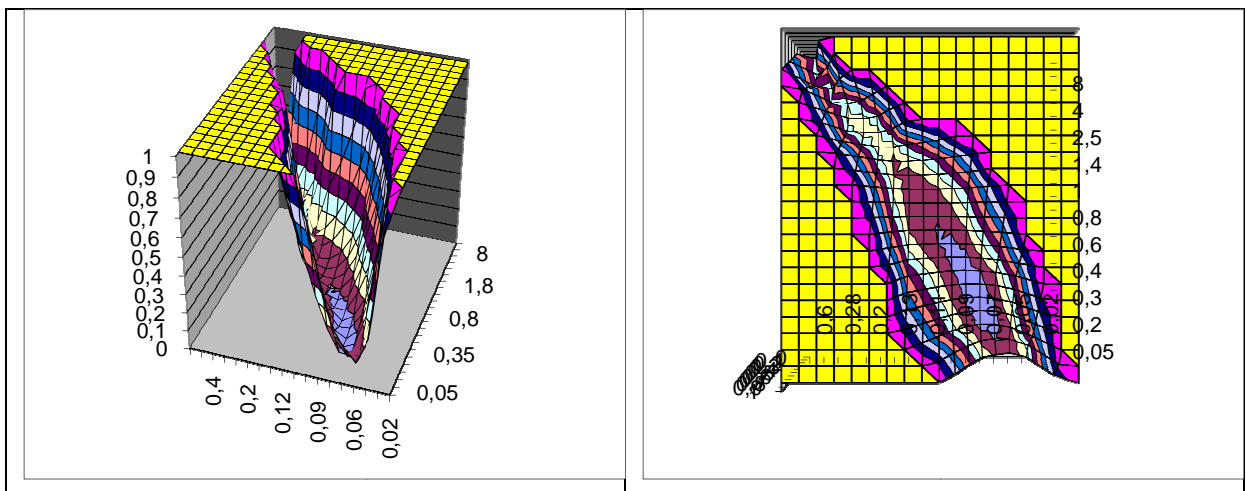


Abb. 35 3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Fed-Batch Prozess.

Die in Kapitel 5.3.1 für den Batch-Reaktor berechneten Werte $K_m = 0,285$ mol/L und $v_{max} = 0,68$ mol/Lh ($v_{max}^E = v_{max}/5 = 0,136$ mol/hg) werden in Tab.7 mit den K_m -und v_{max}^E -Werten für Fed-Batch verglichen.

	v_{max} (mol/hg)	K_M (mol/L)	Fehler
Batch-Prozess durch integrierte M.-M.-Gleichung	0,135	0,285	
Batch-Prozess durch kleinste Fehlerquadrate	0,18	0,53	
Fed-Batch-Prozess durch kleinste Fehlerquadrate	0,077	0,259	0,05078

Tabelle 7 Vergleich von v_{max}^E und K_m für Fed-Batch- und Batch-Prozess.

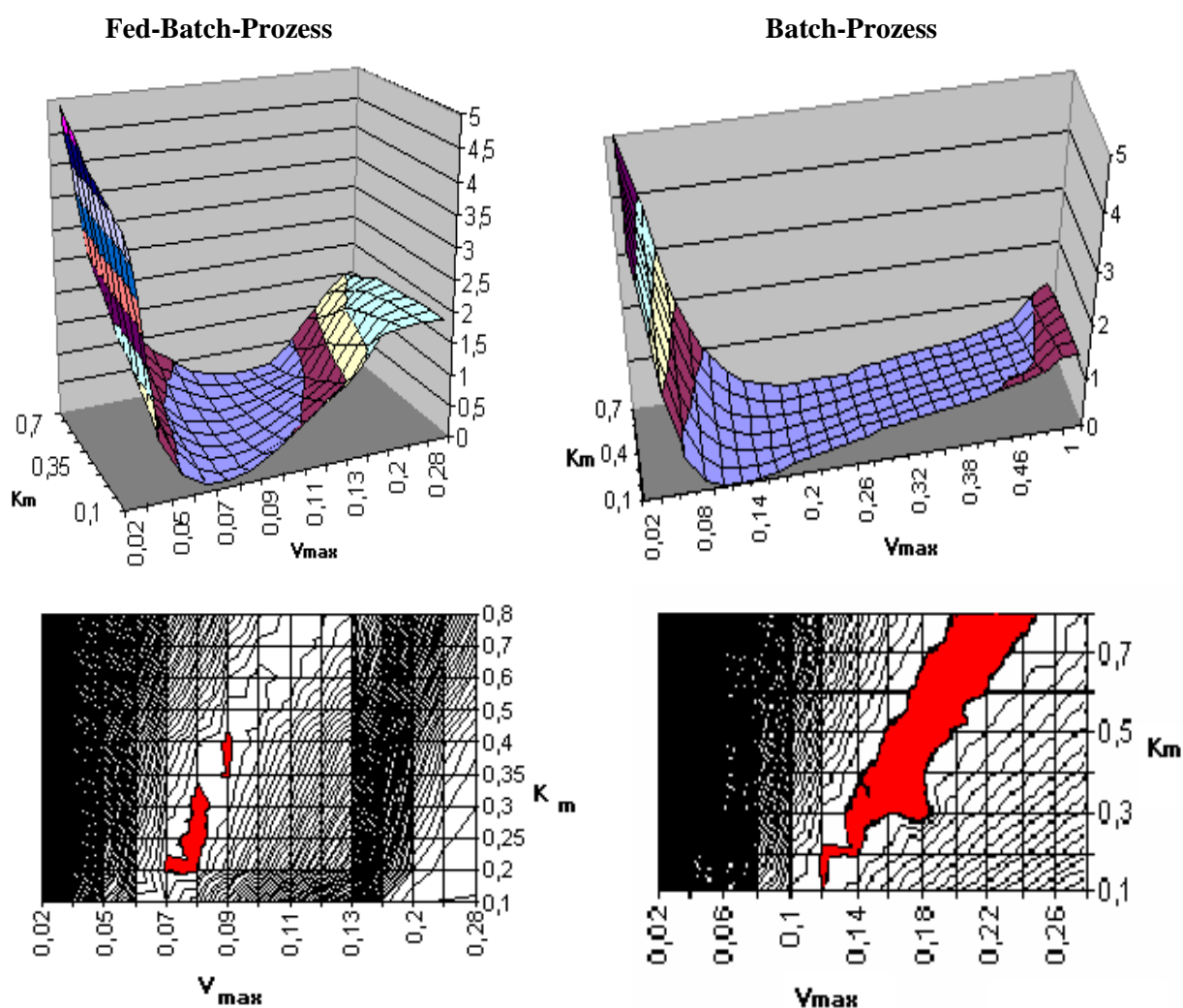


Abb. 36 Gütefunktionale in der Umgebung des Minimums (berechnete optimale Parameter).

In der Abbildung 36 ist die Gütefunktionale in der Umgebung des Minimums (berechnete optimale Parameterwerte) dargestellt. Die tiefsten Ebenen sind rot markiert. In diesen roten Bereichen hat die Gütefunktionale ungefähr die gleichen Werte. Je kleiner dieser Bereich ist, desto genauer wird die Berechnung von v_{\max}^E und K_m . Im Idealfall sollten sich diese rot markierten Flächen zu einem einzigen Punkt verkleinern.

5.3.3 Zusammenfassung Vergleich von Batch-und Fed-Batch-Prozess

In diesem Kapitel wurde bewiesen, dass der Fed-Batch-Prozess bessere Annäherungen als der Batch-Prozess zeigt. In Abbildung 36 zeigt, dass v_{\max} und K_m des Batch Prozesses einen größeren Spielraum haben als beim Fed-Batch Prozess. Die Benutzung des Fed-Batch Prozesses anstelle von Batch Prozessen verbessert somit deutlich die experimentelle Bestimmung der kinetischen Parameter. Die Ermittlung von v_{\max} erfolgt immer mit einer höheren Präzision als von K_m . Die Verbesserung des K_m -Wertes beim Puls-Verfahren ist im Vergleich zum Batch-Reaktor höher.

5.4 Untersuchungen des Parametereinschätzungsfehlers des Michaelis–Menten-Enzymkinetischen Prozesses im Fed Batch Prozess

Das Ziel dieses Kapitels war den Parametereinschätzungsfehler des Michaelis–Menten-Enzymkinetischen Prozesses genauer zu untersuchen, experimentell das Suchgebiet von kinetischen Parametern durch Fed-Batch Prozess zu reduzieren und die Prozess-Bedingungen zu finden, die das höchste Vertrauen während des Parameter-Bewertungsverfahrens ergeben.

5.4.1 Berechnung von v_{max} und K_m von D-IPG im Fed Batch Prozess

Der Berechnungsprozess der Parameter wurde von Prof. Dr. Hitzmann entwickelt, darauf basierend wurde von Dr. Patrick Lindner ein Berechnungsprogramm in Matlab programmiert. Dieses Programm beginnt mit einem geratenen oder vorher berechneten K_m und v_{max} Wert. Durch den Messablauf in Matlab werden idealere Werte für ein neues Experiment von S_0 , Pulsvolumen V_0 und Pulszeit t bestimmt. Durch ein neues Experiment werden verbesserte K_m und v_{max} Werte berechnet und diese Werte von K_m und v_{max} wiederum erneut ins Matlab-Programm eingegeben. Dieser Ablauf kann beliebige Male wiederholt werden.

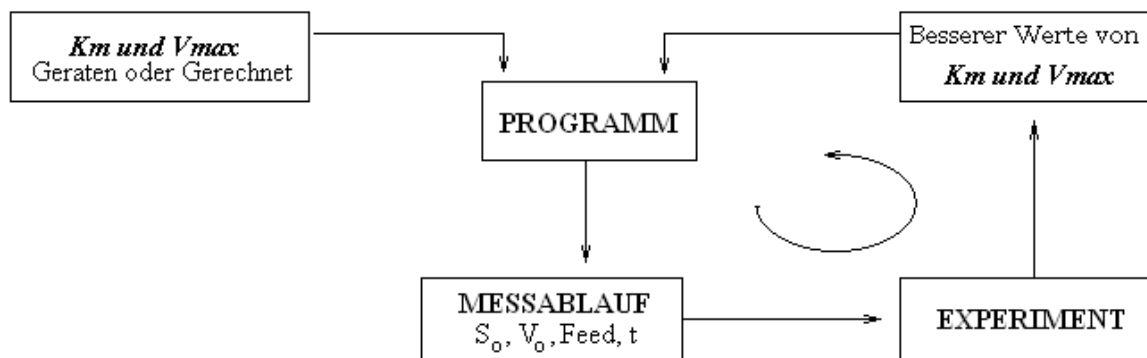


Abb. 37 Rechnungsablauf vom Fed-Batch Prozess.

Die für die Versuchsdurchführung variablen Parameter sind:

Startvolumen, Startkonzentrationen, Zeiten der Probenahmen, Pulszeit, Pulskonzentrationen und Pulsvolumen.

Eine detaillierte Beschreibung des experimentellen Designs in Matlab ist in der Arbeit von Lindner 2006 zu finden.

Dafür wurden die in Kapitel 5.3.3.1 (Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess) berechneten v_{max} und K_m Werte verwendet.

Die angenommenen Rahmenbedingungen für das durchgeführte Experiment sind in der Tabelle 8 angegeben.

Substrat Volume	10 mmol
Gesamt volume V_{total}	10 ml
Anfangs Volumen	2,5 ml
Enzymmenge	50 mg
Probe Volume	0,3 ml
Entnommene Probezahl	10
v_{max}^E (mol/hg)	0,077
K_m (mol/L)	0,259

Tabelle 8 Angenommene Rahmenbedingungen für das Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess.

5.4.2 II. Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess

Das Experiment wurde wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben durchgeführt. Nach 1,25 h, 1,5 h, 2,75 h, 3 h, 3,25 h, 3,5 h, 3,75 h, 4 h, 4,28 h und 4,5 h wurde jeweils 300 μ l große Probe entnommen.

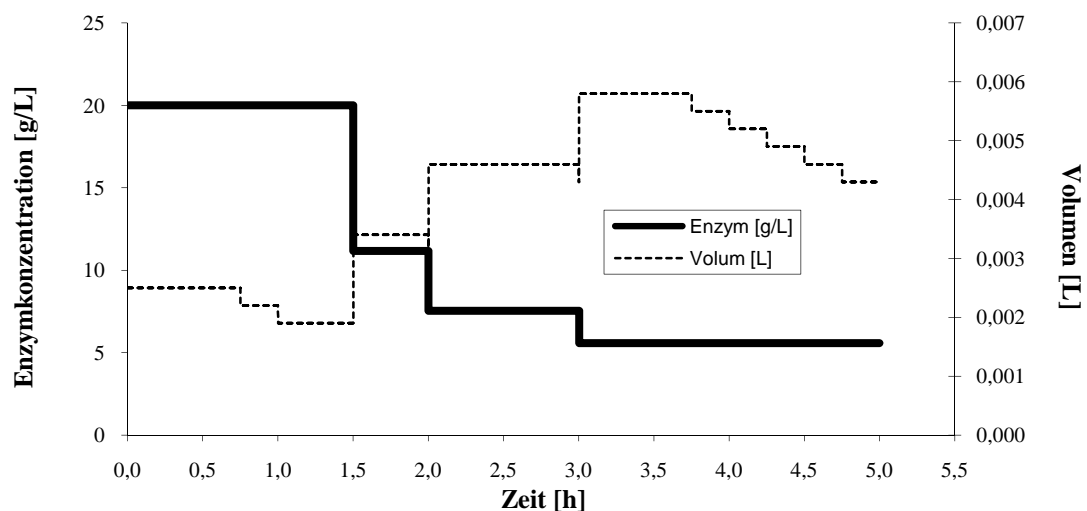


Abb.38 Zeitlicher Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens vom D-IPG.

In Abbildung 38 sind der zeitliche Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens dargestellt. Mit jedem Puls nimmt die Enzymkonzentration ab und das Reaktionsvolumen zu. Durch die Probenahme verringert sich das Reaktionsvolumen, die Enzymkonzentration bleibt jedoch konstant.

Die nach der fünfstündigen Versuchsdurchführung erhaltenen zehn Proben wurden gaschromatographisch analysiert.

5.4.2.1 II. Puls Experiment I. Versuch

In Abbildung 39 ist der zeitliche Substrat-Konzentrationsverlauf vom D-IPG des Puls-Experiments grafisch dargestellt.

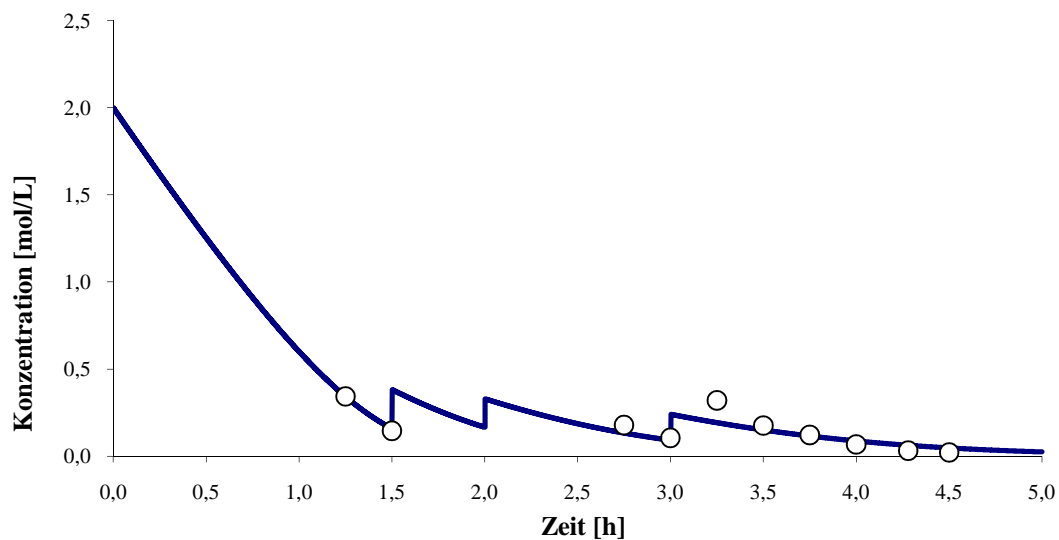


Abb.39 Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom D-IPG beim Fed-Batch-Prozess (Puls-Experiment).

Die Parameter v_{max} und K_m wurden durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet. Durch diese Methode ergeben sich die Werte $K_m = 0,35$ mol/L und $v_{max} = 0,091$ mol/h und Fehlerquadrate 0,02118.

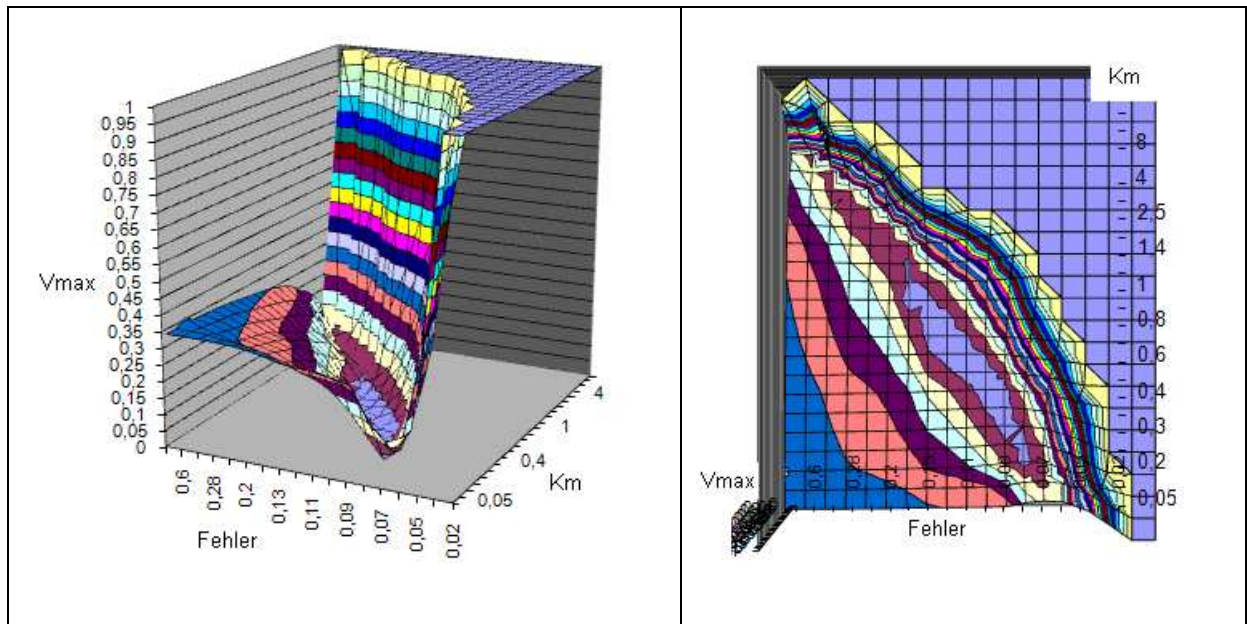


Abb. 40 3D Ansicht von V_{max} , K_m und Fehler Rechnungen im Fed-Batch Prozess II. Plus I. Versuch.

5.4.2.2 II. Puls Experiment II. Versuch

In Abbildung 41 ist der zeitliche Konzentrationsverlauf vom D-IPG des Puls-Experiments grafisch dargestellt.

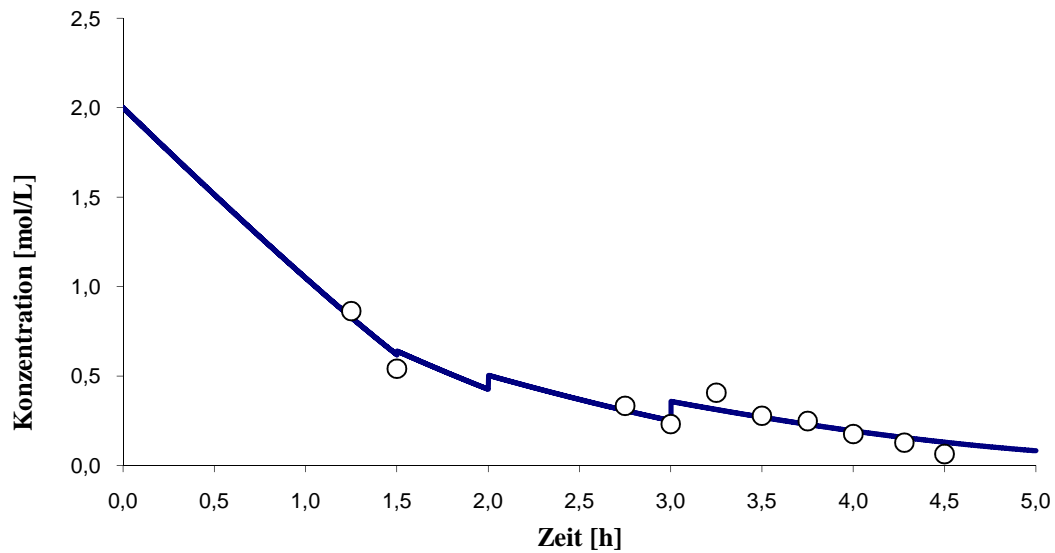


Abb.41 Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom D-IPG beim Fed-Batch-Prozess II. Puls II. Versuch.

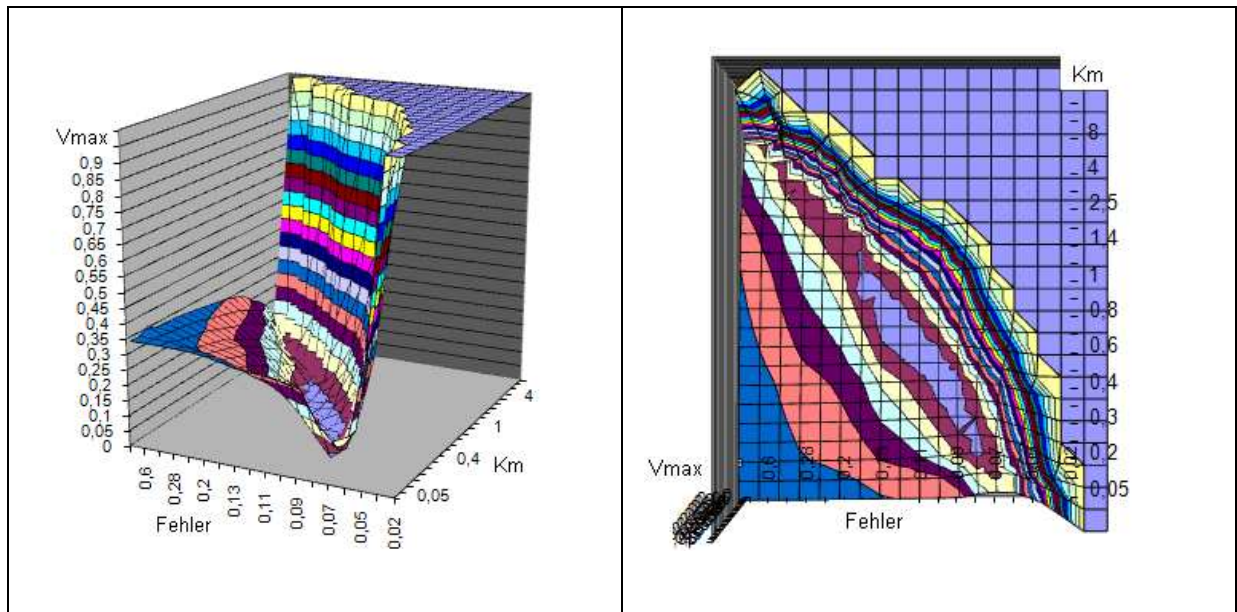


Abb. 42 3D Ansicht von V_{max} , K_m und Fehlerrechnungen im Fed-Batch Prozess II. Puls II. Versuch.

In den Abbildungen 40 und 42 ist eine einseitige Deformation der Krümmung zu sehen. Diese Deformation kommt höchstwahrscheinlich dadurch zustande, dass der Reaktionsmechanismus nicht genau nach der Michaelis-Menten Kinetik erfolgt.

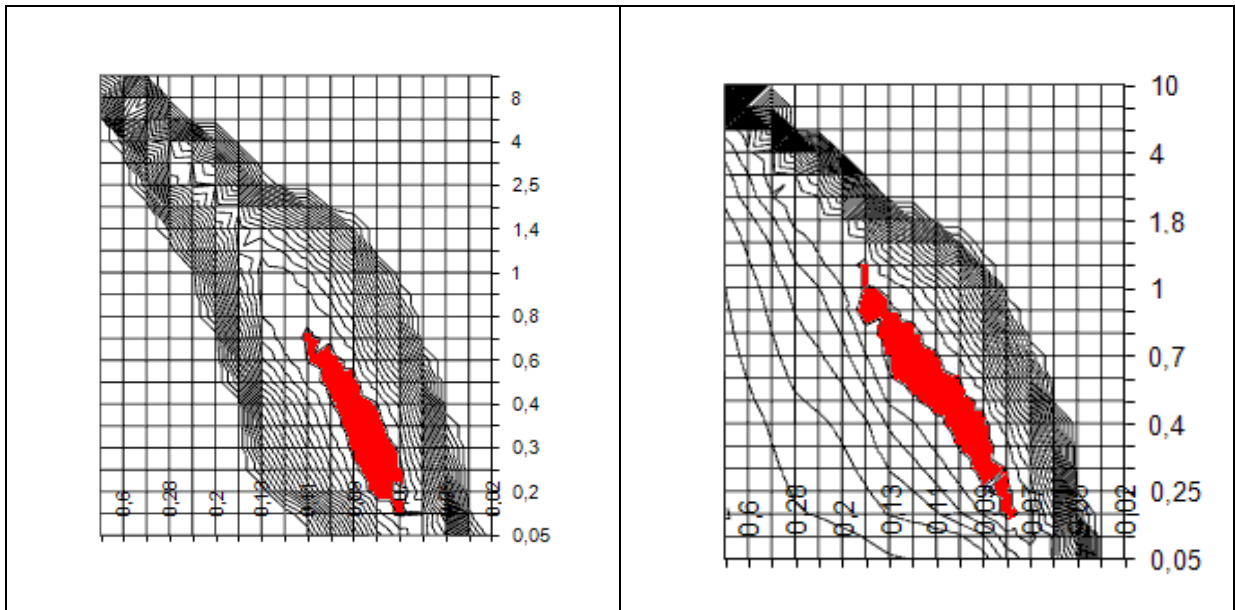


Abb. 43 3D Ansicht von v_{max} , K_m und Fehlerrechnungen im Fed-Batch Prozess II. Puls II. versuch.

Bei Betrachtung der tiefsten Ebene in Abbildung 43 wird ersichtlich, dass das II. Puls Experiment trotz der Deformation ein kleineres Suchgebiet hat als das I. Puls Experiment. Diese Verminderung des Suchgebiets von K_m und v_{max} beträgt beim II. Puls Experiment ca. 27 Prozent.

Durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate Rechnungen wird $K_m = 0,23 \text{ mol/L}$, $v_{max} = 0,055 \text{ mol/h}$ und Fehler 0,02169 berechnet.

Im I. Versuch wurde $K_m = 0,35 \text{ mol/L}$ und $v_{max} = 0,091 \text{ mol/h}$ berechnet. Dieser Unterschied kommt dadurch zu Stande, dass die K_m und v_{max} Werte einen größeren Spielraum im Suchgebiet der Kinetischen Parameter haben.

5.4.3 III. Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess

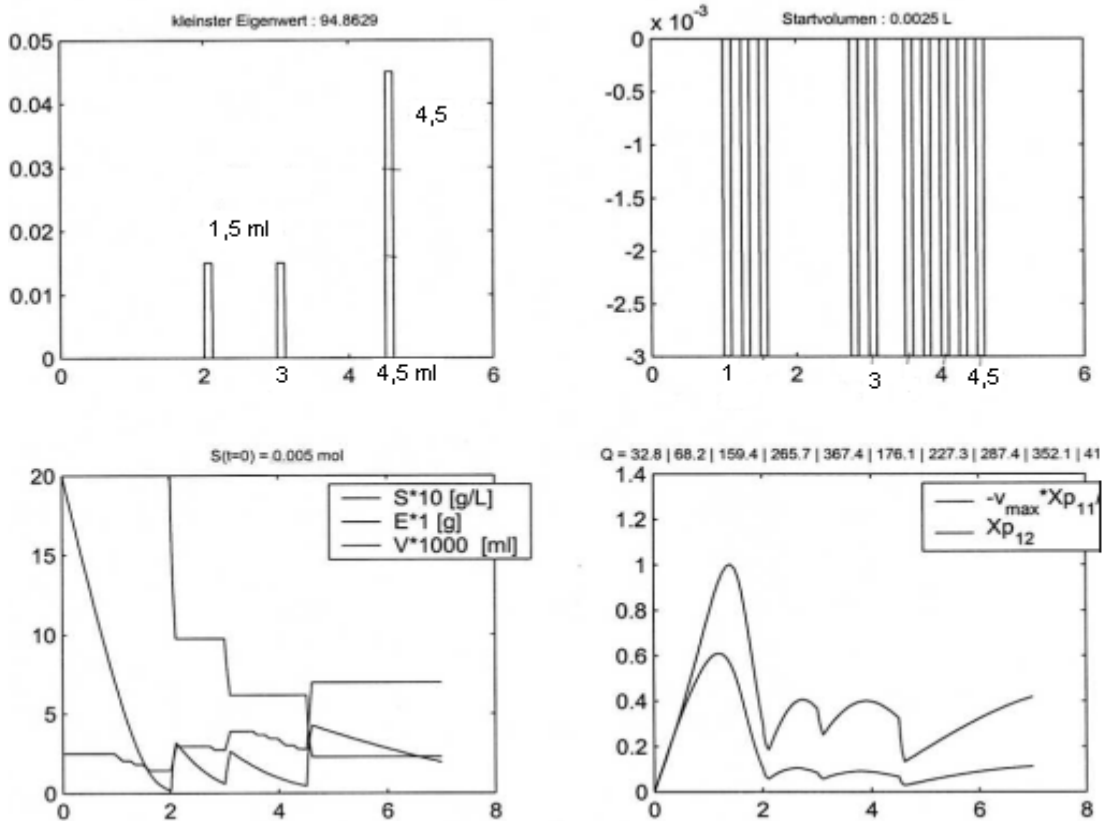


Abb.44 Durch Matlab berechnete ideale Reaktionsbedingungen für das III. Puls Experiment von D-IPG.

Nach 2 und 3 Stunden wurde der Reaktionsmischung eine 1,5 ml Lösung aus 0,67 mmol D-IPG als erster und zweiter Puls hinzugefügt. Der dritte Puls (4,5 ml) erfolgte nach 4,5 Stunden direkt nach der Probenahme. Nach 1 h, 1,25 h, 1,5 h, 2,75 h, 3 h, 3,5 h, 3,75 h, 4 h, 4,25 h und 4,5 h wurde jeweils 300 µl große Probe entnommen.

Dieses Experiment wurde mit dem Matlab - Programm dreimal durchgerechnet und durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate das v_{max} und K_m berechnet.

	K_m (mol/L)	v_{max} (mol/hg)	Fehler
1. Versuch	1,5329	0,3462	0,2682
2. Versuch	0,9068	0,2092	0,000197
3. Versuch	1,253	0,2797	1,1862

Tabelle 9 K_m und v_{max} Werte vom III. Plus Experiment.

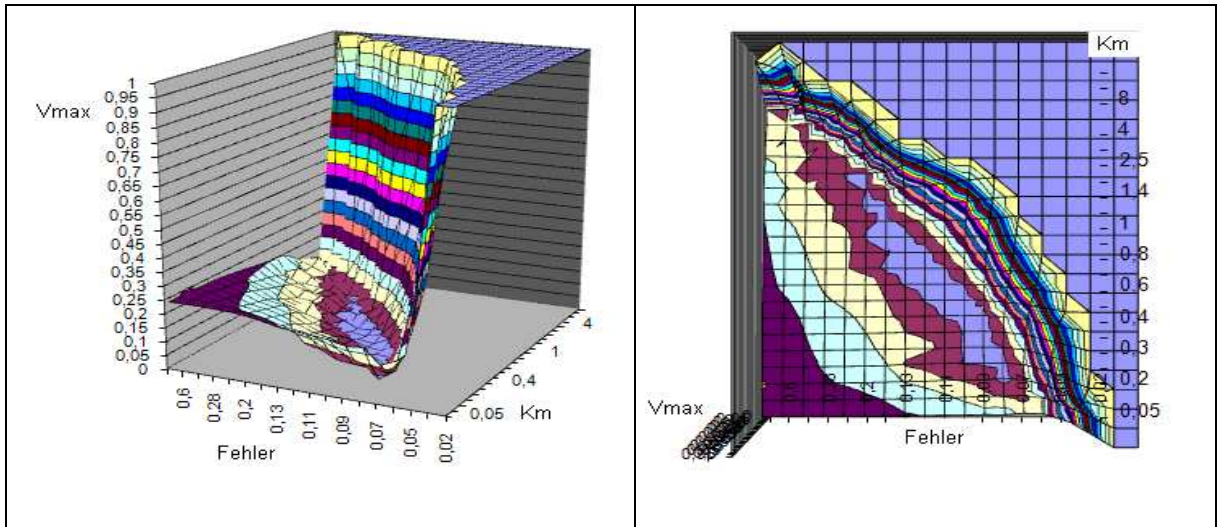
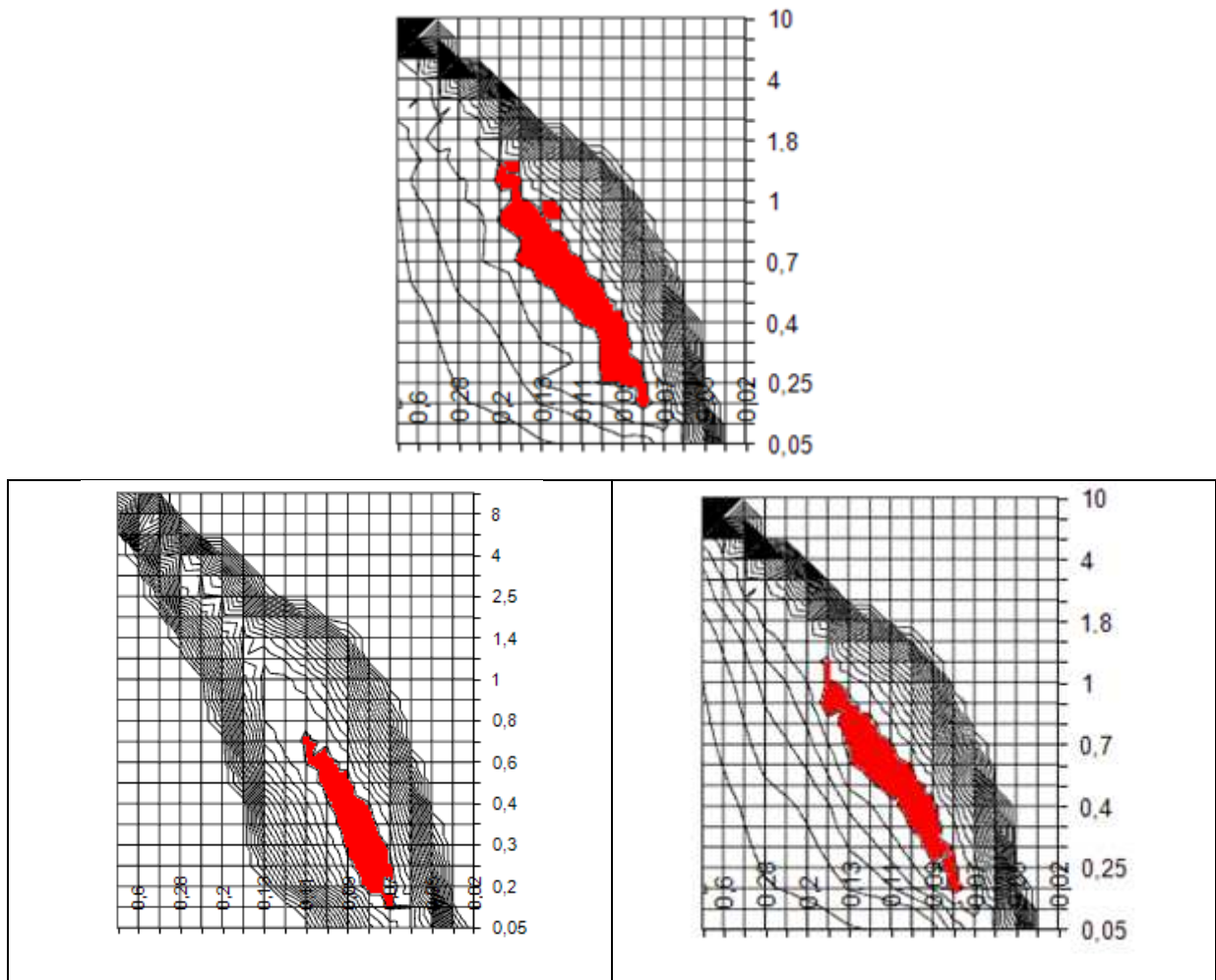


Abb. 45 3D Ansicht von V_{max} , K_m und Fehlerrechnungen im Fed-Batch Prozess im III. Versuch.

III. Puls Experiment im Fed Batch Prozess



II. Puls Experiment im Fed Batch Prozess

I. Puls Experiment im Fed Batch Prozess

Abb. 46 3D Ansicht von V_{max} , K_m und Fehlerrechnungen im Fed-Batch Prozess.

Die tiefsten Ebenen der drei Experimente (Abb. 46) zeigen, dass der rote Bereich vom III. Experiment gegenüber dem I. Puls-Experiment um 35 Prozent und gegenüber dem II Puls-Experiment um 52 Prozent größer ist. Die Deformation der Krümmung erreicht hierbei fast den Boden.

5.4.4 IV. Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess

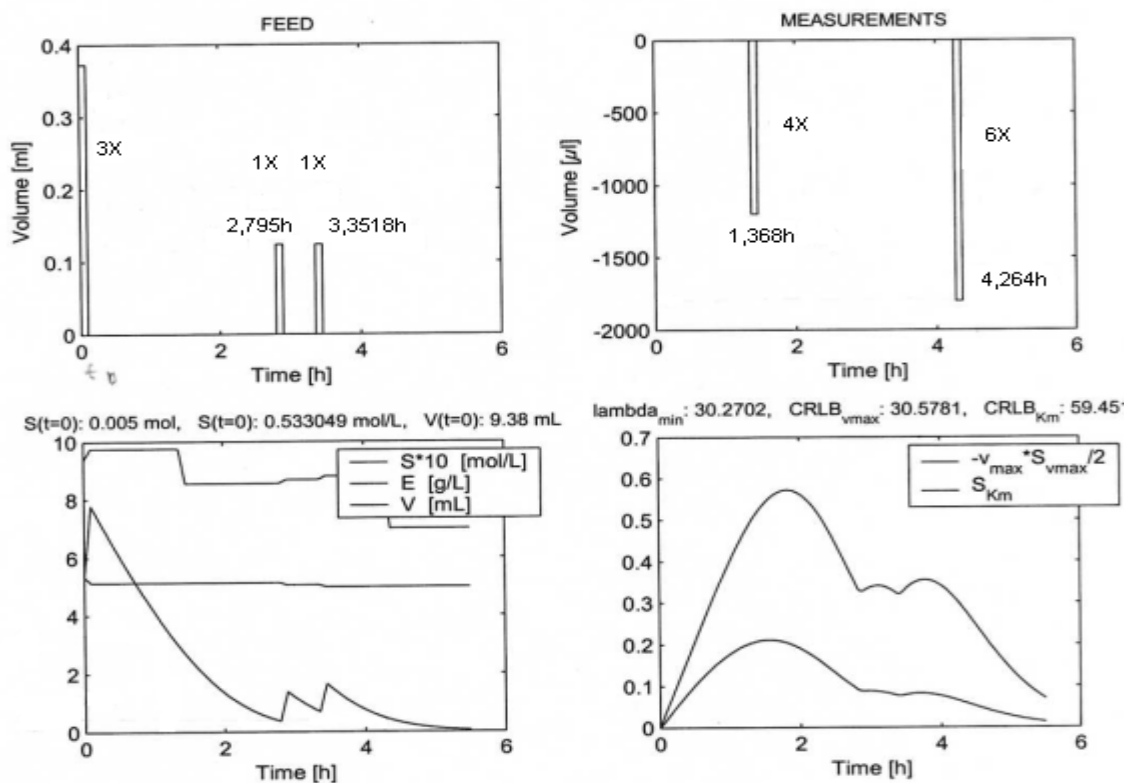


Abb. 47 Durch Matlab berechnete ideale Reaktionbednignungen für das IV. Puls Experiment von D-IPG.

Nach 2,795 und 3,351 Stunden wurde der Reaktionsmischung eine 1,5 ml Lösung aus 0,67 mmol D-IPG als zweiter und dritter Puls hinzugefügt. Der erste Puls (4,5 ml) erfolgte direkt nach dem Reaktionsanfang. Nach 1,368 Stunden wurden vier Proben und nach 4,264 Stunden werden sechs Proben von je 300 μl entnommen.

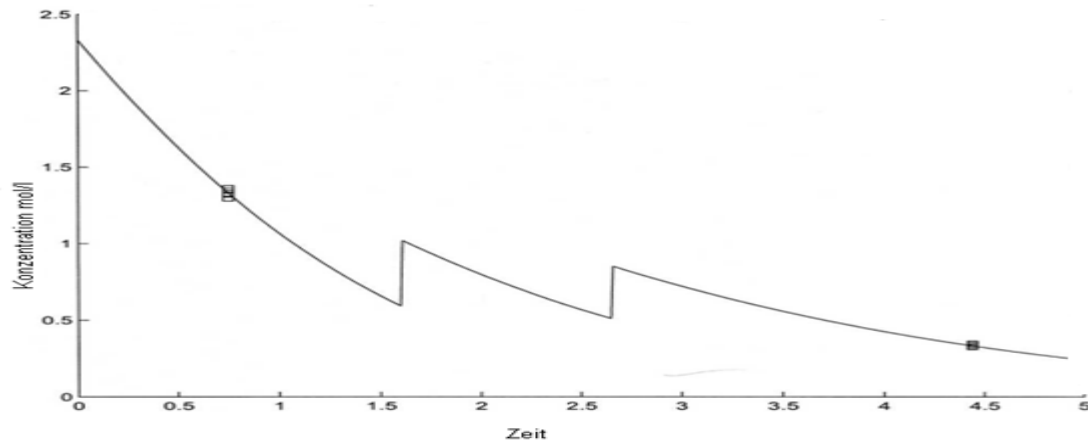


Abb.48 Zeitlicher Konzentrationsverlauf vom D-IPG beim Fed-Batch-Prozess IV. Puls Experiment.

In Abbildung 48 ist der zeitliche Konzentrationsverlauf vom D-IPG des Puls-Experiments grafisch dargestellt.

Dieses Experiment wurde mit dem Matlab - Programm dreimal durchgeführt und durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate das v_{max} und K_m berechnet.

	K_m (mol/L)	v_{max} (mol/hg)	Fehler
1. Versuch	2,3017	0,1837	0,00319
2. Versuch	11,7886	0,6102	0,00289
3. Versuch	5,8846	0,4122	0,00319

Tabelle 10 K_m und v_{max} Werte vom IV. Puls Experiment.

In der Tabelle 10 wird ersichtlich, dass die K_m Werte stark variieren. Dies kommt dadurch zustande, dass die graphische Deformation des Fehlers den Boden erreicht.

In Tabelle 11 sind die gesamten K_m und v_{max} –Werte vom D-IPG des Puls-Experiments dargestellt.

		K_m	v_{max}	Fehler
Batch-Prozess integrierte M-M-Gleichung		0,285	0,135	
1. Plus EXP		0,25	0,077	0,05078
2. Plus EXP	1. Versuch	0,35	0,091	0,02118
	2. Versuch	0,23	0,055	0,02169
3. Plus EXP	1. Versuch	1,5329	0,3462	0,2882
	2. Versuch	0,9068	0,2092	0,00197
	3. Versuch	1,253	0,2797	1,1862
4. Plus EXP	1. Versuch	2,3017	0,1837	0,00319
	2. Versuch	11,7886	0,6102	0,00289
	3. Versuch	5,8846	0,4122	0,00319

Tabelle.11 Gesamte K_m und v_{max} –Werte vom D-IPG des Puls-Experiments.

Tabelle 11 zeigt, dass die K_m und v_{max} Werte von Experiment zu Experiment eine größere Schwankungen besitzen. Diese Schwankungen kommen höchstwahrscheinlich dadurch zustande, dass der Reaktionsmechanismus nicht genau nach der Michaelis-Menten Kinetik erfolgt.

5.4.4 Zusammenfassung Parametereinschätzungsfehler des Michaelis–Menten-Enzymkinetischen Prozesses

Der Parametereinschätzungsfehler des Michaelis–Menten-Enzymkinetischen Prozesses wurde in Kapitel 5.4 untersucht.

Durch die experimentellen Wiederholungen wurde eine Deformation der dreidimensionalen Fehlerabbildung deutlich. Diese Deformation kommt höchstwahrscheinlich dadurch zustande, dass der Reaktionsmechanismus nicht genau nach der Michaelis-Menten Kinetik erfolgt.

Trotz der Deformation wird aus der Abbildung 43 ersichtlich, dass das II. Puls Experiment ein kleineres Suchgebiet als das I. Puls Experiment hat. Diese Verminderung des Suchgebiets von K_m und v_{max} beträgt beim II. Puls Experiment ca. 27 Prozent.

Durch die Einbeziehung einer Versuchsplanung hat sich gezeigt, dass eine bedeutende Verbesserung in der Bewertungspräzision - obwohl die D-IPG Enzymatische Reaktion nicht genau nach dem Michaelis-Menten Enzymkinetik Verfahren verlaufen - erzielt werden kann.

Bis zur dritten Wiederholung des L-IPG-Puls-Experimentes wird im analytischen Verfahren der Fischer-Informationsmatrix der Raum von K_m und v_{max} deutlich verkleinert.

Wenn man die tiefsten Ebenen der ersten drei Experimente aus der Abbildung 46 genauer betrachtet, wird ersichtlich, dass der rote Bereich (Fehlerbereich) vom III. Puls Experiment gegenüber dem I Puls-Experiment um 35 Prozent und gegenüber dem II Puls-Experiment um 52 Prozent größer ist. Die Deformation der Krümmung, welche in der 3D Ansicht zu sehen ist, erreicht hierbei fast den Boden. Beim IV. und V. Puls Experiment erreicht die Deformation die tiefste Ebene, was darin resultiert, dass die K_m und v_{max} Werte in einem größeren Fehlersuchgebiet liegen.

Deshalb wurde nach einem neuen Experiment in der Literatur recherchiert, das genau der Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Im nächsten Kapitel wird dieses Experiment vorgestellt.

5.5 Die Oxidation von L-DOPA durch aus Pilzen isolierter *Tyrosinase* in das gefärbte Dopachrom.

Bei dem gewählten Experiment wurde die Oxidation von L-DOPA in das gefärbte Dopachrom durch *Tyrosinase* untersucht, die nach der Michaelis-Menten Gleichung abläuft (Abb. 49).

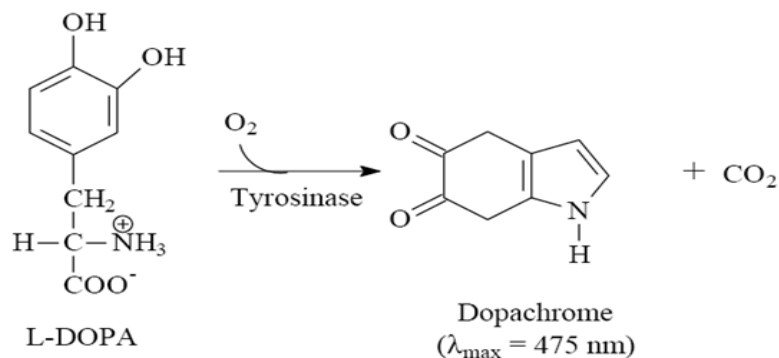


Abb. 49 Die Oxidation von L-Dopa zu Dopachrom.

Für die Ermittlung der Parameter wurde ein experimentelles Annäherungsverfahren aufgestellt, welches genau der Michaelis-Menten Enzymkinetik folgt. Dieses kinetische Verfahren ist ausschließlich nur für Enzymreaktionen gültig, die irreversibel sind. Für eine gute Annäherung an die realen Parameterwerte ist es Voraussetzung, dass grobe Schätzungen der Parameter im Voraus bekannt sein müssen.

In der Tabelle 12 sind einige Werte für K_m und v_{max} aus der Literatur gezeigt.

Literatur	K_m	v_{max}
Solano-Munoz 1985	0,178±0,025 (mol/L)	1,43±0,12(μmol/L.s)
Cabrera-Valladares-2006	0.17 (mM)	
McMahona-2007	0,23±0,01(mM)	386 ±7 (untils/ml)
Xie-2007	0.615 ± 0.010 (mM)	150 ± 2,50(μM/min)

Tabelle 12 K_m und v_{max} -Werte für L-Dopa des Pilzes *Tyrosinase*.

Die angenommenen Rahmenbedingungen für das durchgeführte Experiment sind in der Tabelle 13 angegeben.

Substrat Volume	7,1 mmol/L
Gesamt volume V_{total}	10 ml
Start Volumen	7,5 ml
Puls Konzentration	14,2 mmol/L
Enzymmenge	50 mg
v_{max}^E (mol/hg)	0,077
K_m (mol/L)	0,259

Tabelle 13 Für das Puls Experiment von IPG im Fed Batch Prozess angenommene Rahmenbedingungen.

5.5.1 Kalibrationsgerade zur Berechnung der Dopachrom-Konzentration

Die Umsetzung von L-DOPA in das gefärbte Dopachrom wurde spektral-photometrisch verfolgt. Um die Konzentration berechnen zu können, wurden eine Kalibrationsgerade für Dopachrom erstellt. Das L-DOPA wird in bestimmter (10 mmol/L) Konzentration in das farbig zusammengesetzte Dopachrome umgewandelt. Von dieser Stammlösung werden 0,7-10 mmol/L Lösungen mit Puffer verdünnt und in dem UV-Spetralphotometrie analysiert.

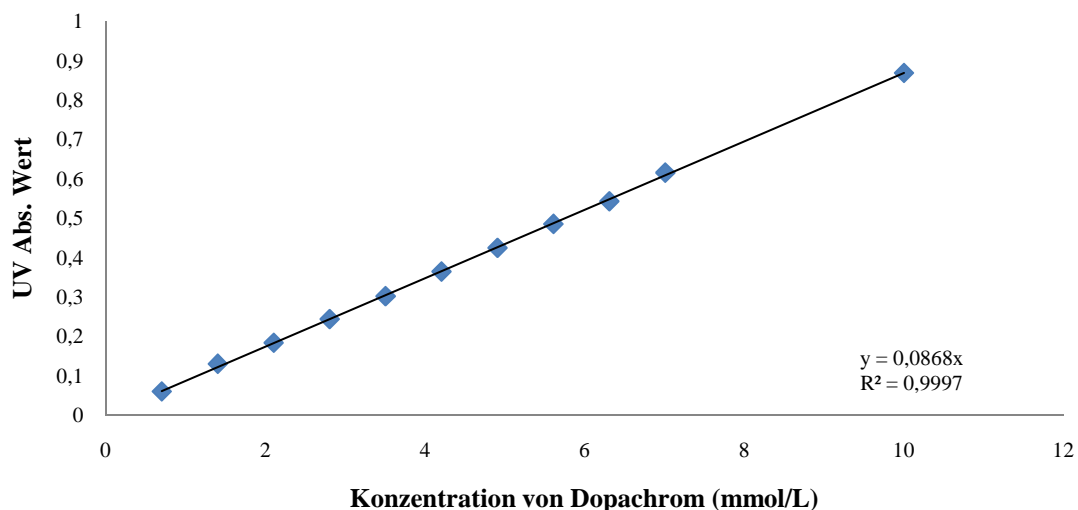


Abb. 50 Kalibrationsgerade von Dopachrom.

5.5.2 Optimierung vom L-DOPA Experiment

In diesem Kapitel wurde der Einfluss der Temperatur, der Substratkonzentrationen und der Enzymmenge auf das L-DOPA Experiment untersucht.

Die katalytische Umsetzung wurde dabei mittels UV-Spektrophotometrie verfolgt.

Das Experiment wurde im Batchansatz bei Raumtemperatur (25 °C) durchgeführt. In einem 50 ml Glaskolben wurden 10 mmol L-DOPA in 30 ml NaH_2PO_4 -Puffer eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 μl *Tyrosinase* (0.5 mg/ml) gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde mittels einer Gilson-Schlauchpumpe bei einer Geschwindigkeit von ca. 7 ml/min durch die Küvette gepumpt. Die Umsetzung wurde spektral-photometrisch verfolgt.

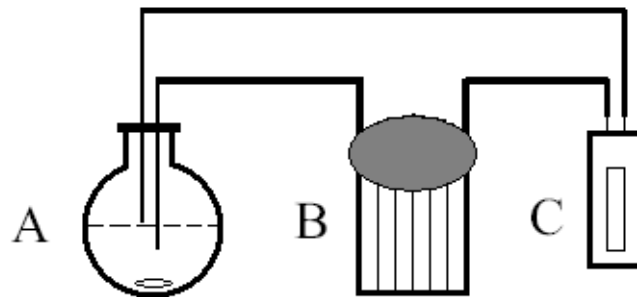


Abb. 51 Schematische Zeichnung der Umlaufapparatur von L-DOPA.
A: temperiertes Vorratsgefäß mit Rührfisch,
B: Gilson-Schlauchpumpe,
C: Suprasil-Durchflussküvette im Spektralphotometer.

5.5.2.1 Einfluss der Substratkonzentration auf die enzymatische Reaktion

In einer 1 ml Küvette wurden 5,071, 6,0855, 7,1, 8,114 bzw. 10,1428 mmol L-DOPA vorgelegt. Durch Zugabe von 50 μ l Lipase wurde die Reaktion gestartet. Das Gesamtvolumen der Reaktion lag bei 1 ml.

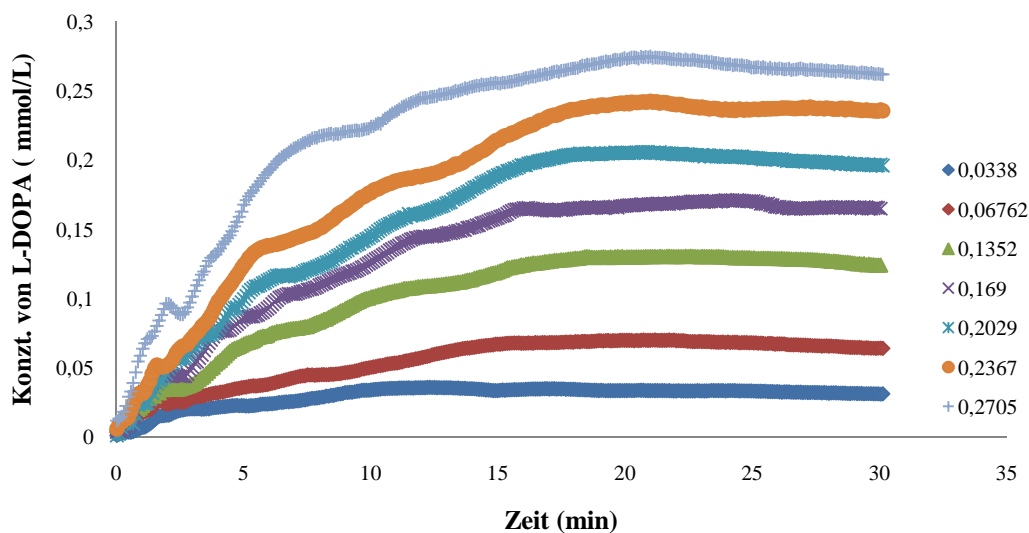


Abb. 52 Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von L-DOPA in Dopachrom bei 25 °C und verschiedenen L-DOPA-Konzentrationen.

Der zeitliche Verlauf der katalytischen Reaktion ist in Abbildung 52 dargestellt.

Bei höheren Produktkonzentrationen bildeten sich Partikel in der Lösung, wodurch die Messung gestört wurde.

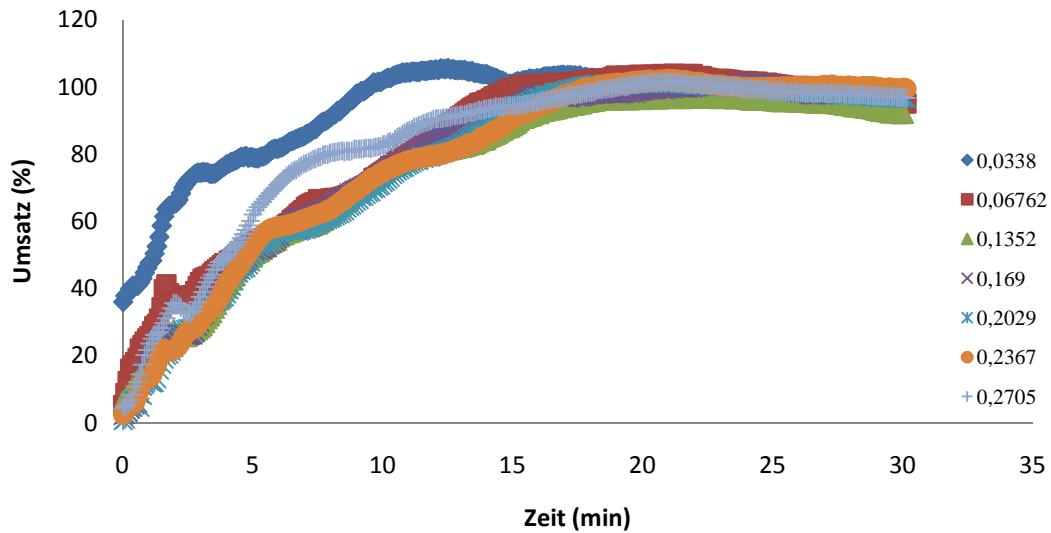


Abb. 53 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes bei verschiedenen L-DOPA-Konzentrationen.

5.5.2.2 Einfluss der Enzymkonzentration auf die enzymatische Reaktion

In diesem Kapitel wird der Einfluss der Lipasemenge auf den Reaktionsablauf untersucht.

Um die ideale Enzymkonzentration zu ermitteln, wurde eine 0,4 mmol/L L-DOPA Lösung mit verschiedenen Lipase-Konzentrationen bei 25 °C in Reaktion gebracht.

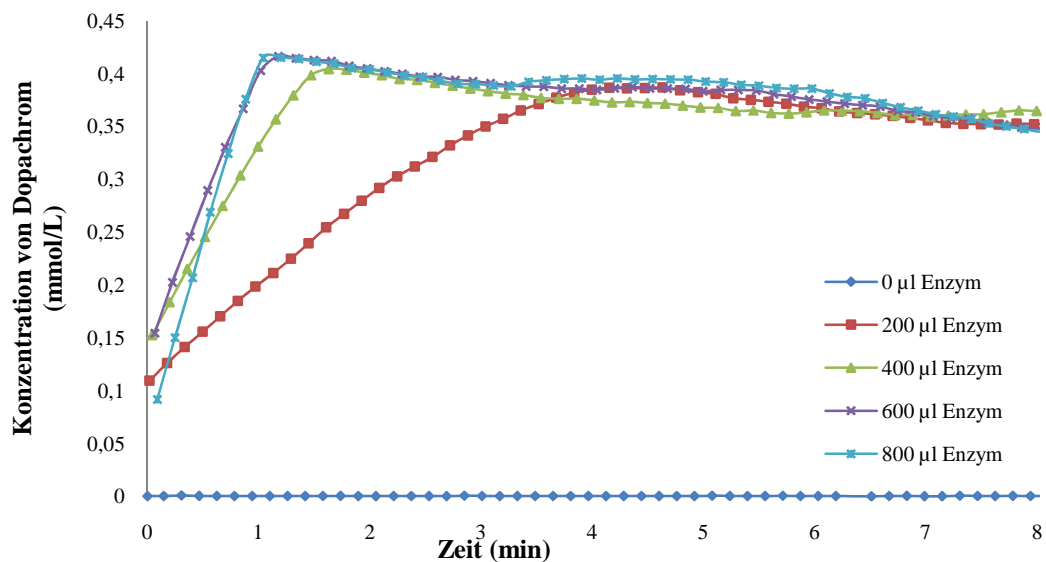


Abb. 54 Bestimmung der optimalen Enzykonzentration bei der Umsetzung von L-DOPA.

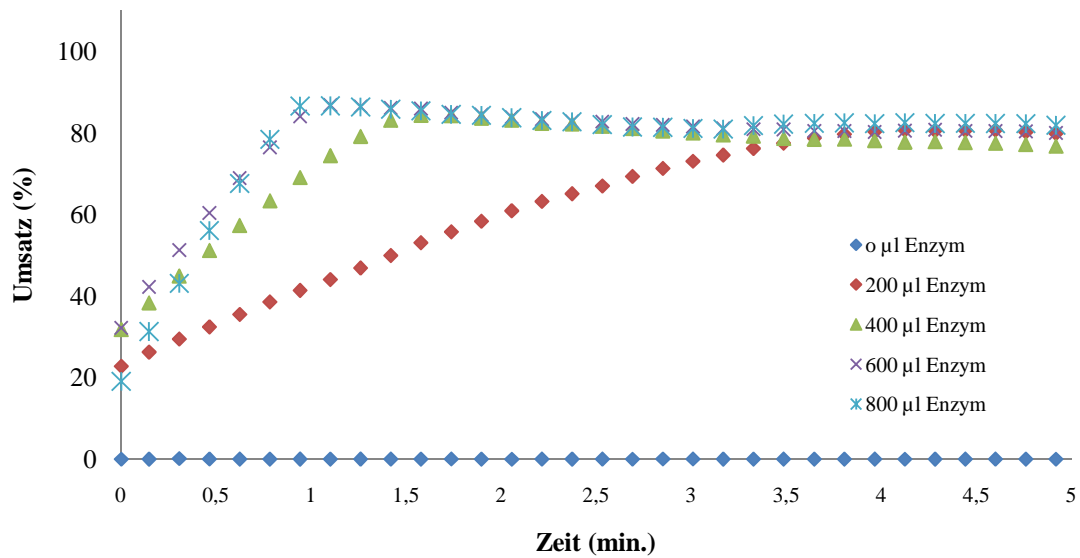


Abb. 55 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.

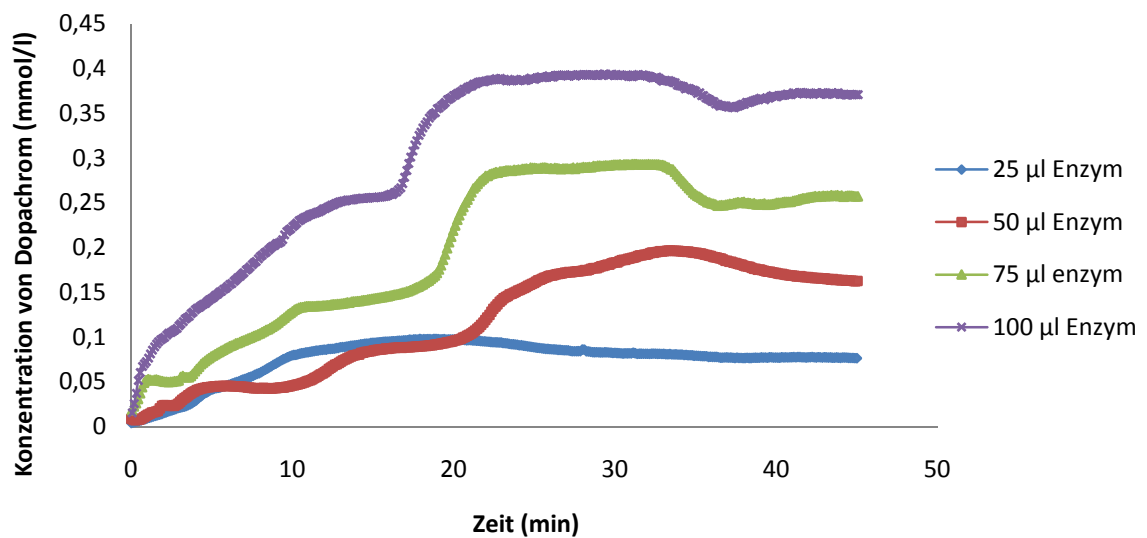


Abb. 56 Zeitlicher Verlauf der Dopachrom-Bildung bei verschiedenen Lipasemengen und 25°C.

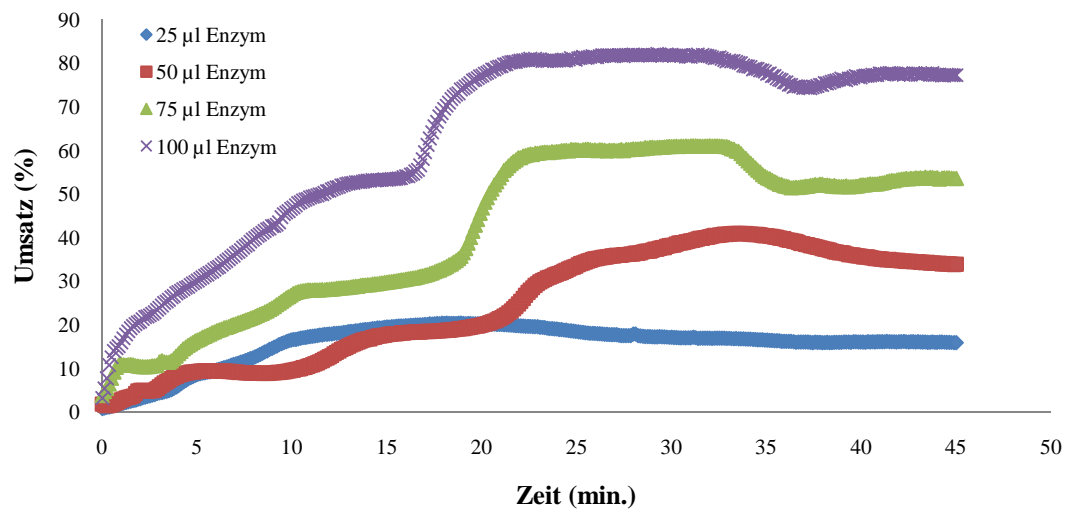


Abb. 57 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei verschiedenen Enzymkonzentrationen.

5.5.2.3 Temperatureinfluss auf die Reaktion

In diesem Kapitel wird untersucht, inwieweit eine Veränderung der Temperatur die Reaktion beschleunigt oder verlangsamt.

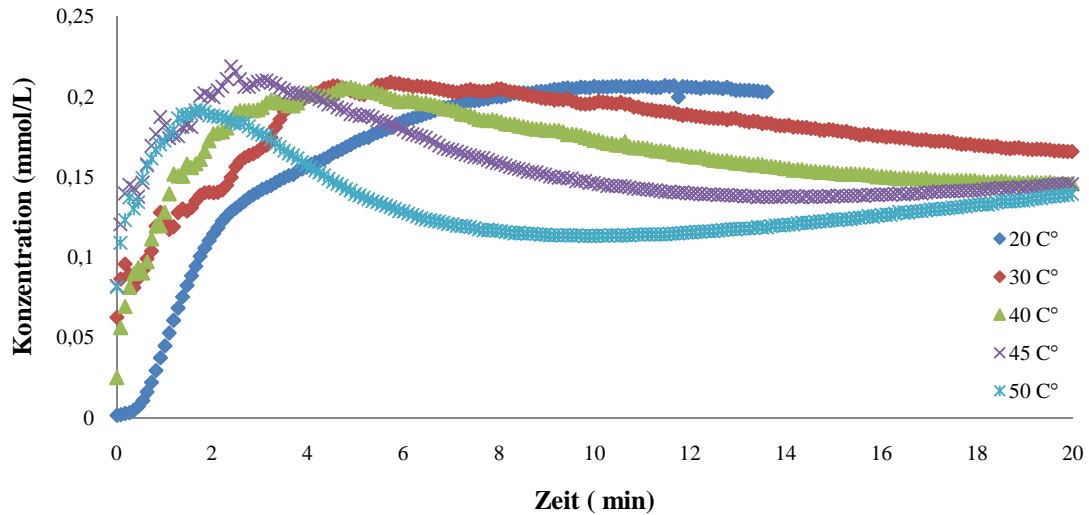


Abb. 58 Zeitlicher Verlauf der Dopachrombildung bei verschiedenen Temperaturen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit und gleichzeitig der Umsatz steigen mit zunehmender Temperatur an. Die Versuchstemperatur 30 °C stellt einen Wendepunkt dar, oberhalb dieser Temperatur bleibt der Reaktionsumsatz relativ konstant, unterhalb dieser Temperatur nimmt der Reaktionsumsatz deutlich ab. Der UV-Spektrometer ist für die Untersuchungen bei höheren Temperaturen (ab 25 °C) ungeeignet, weil die Erhöhung der Konzentration zu einer Partikelbildung bei dem Dopachrom führt und dadurch Messfehler resultieren.

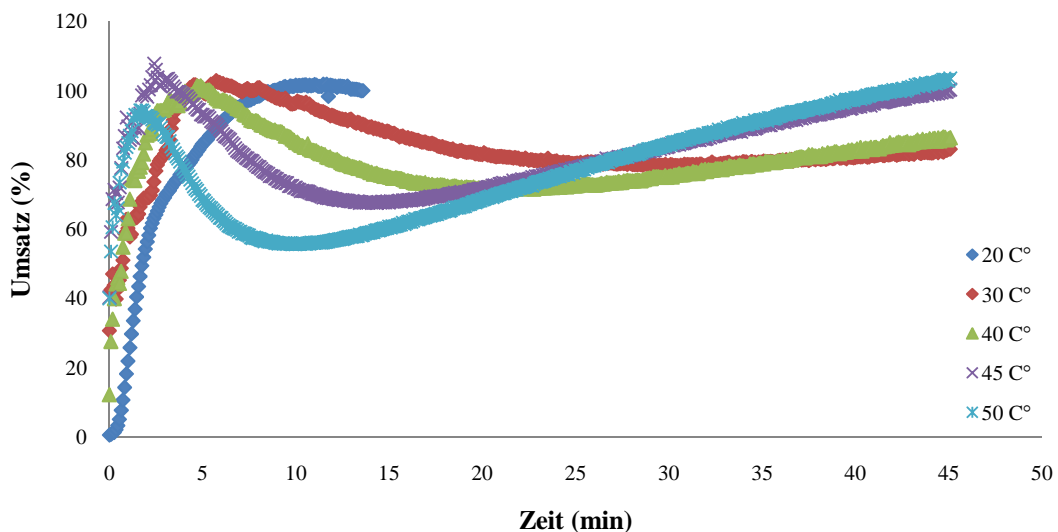


Abb. 59 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei verschiedenen Temperaturen.

5.5.3 Die Oxidation von L-DOPA im Batch Prozess

Um die Parametereinschätzungsfehler des Michaelis–Menten-Enzymskinetischen Prozesses zu untersuchen, werden L-DOPA mit der Tyrosinase in einer Reaktion eingesetzt. Als Reaktionstemperatur wird 25 °C gewählt.

5.5.3.1 I. Experiment zur Oxidation von L-DOPA im Batch Prozess

10 ml 7,1 mmol L-DOPA wurde in 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Puffer hergestellt und in einen 50 ml Glaskolben eingefüllt. Die Reaktion wurde mit 500 μl Lipase gestartet.

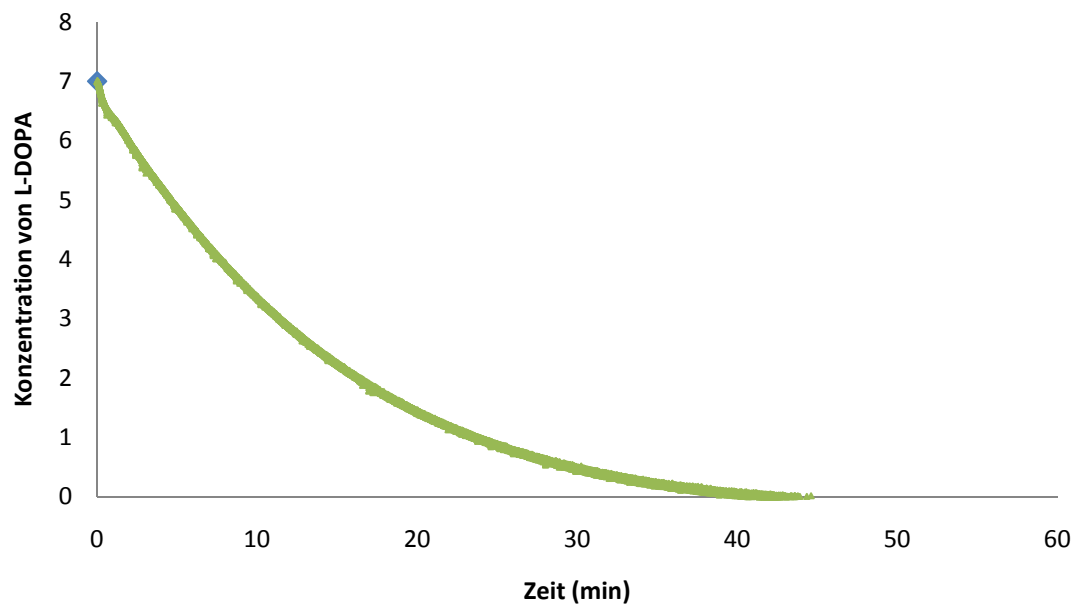


Abb. 60 Zeitlicher Verlauf der Konzentration von L-DOPA bei 25 °C.

In der Abbildung 60 ist der Konzentrationsverlauf von L-DOPA dargestellt.

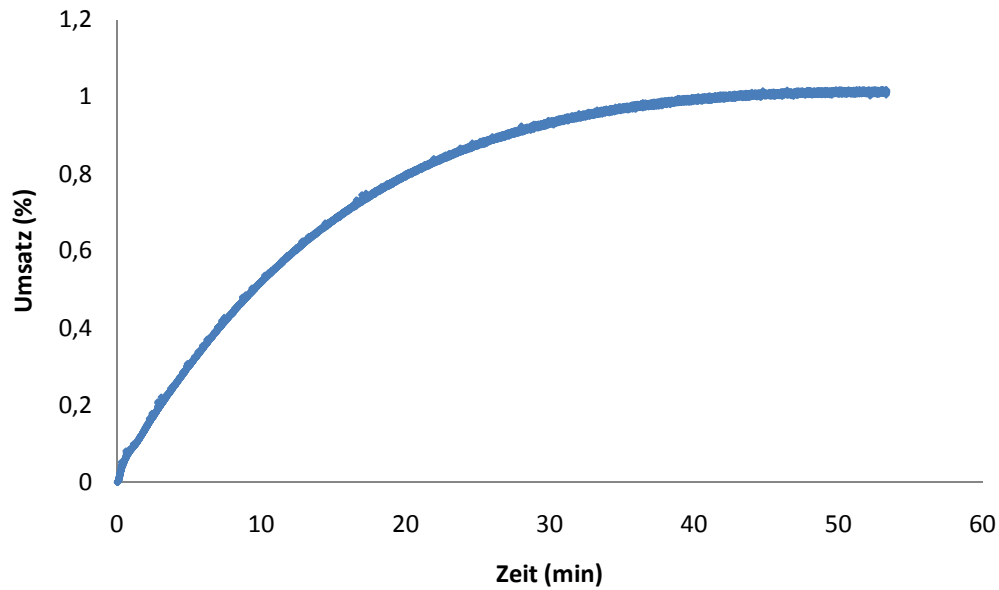


Abb. 61 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei 25 °C.

Bei der Versuchstemperatur von 25°C steigt nach 40 Minuten der Umsatz auf 98,36 % an.

Um die v_{max} - und K_m -Werte zu errechnen, wurde die integrierte Michaelis-Menten-Gleichung verwendet (Abb. 62)..

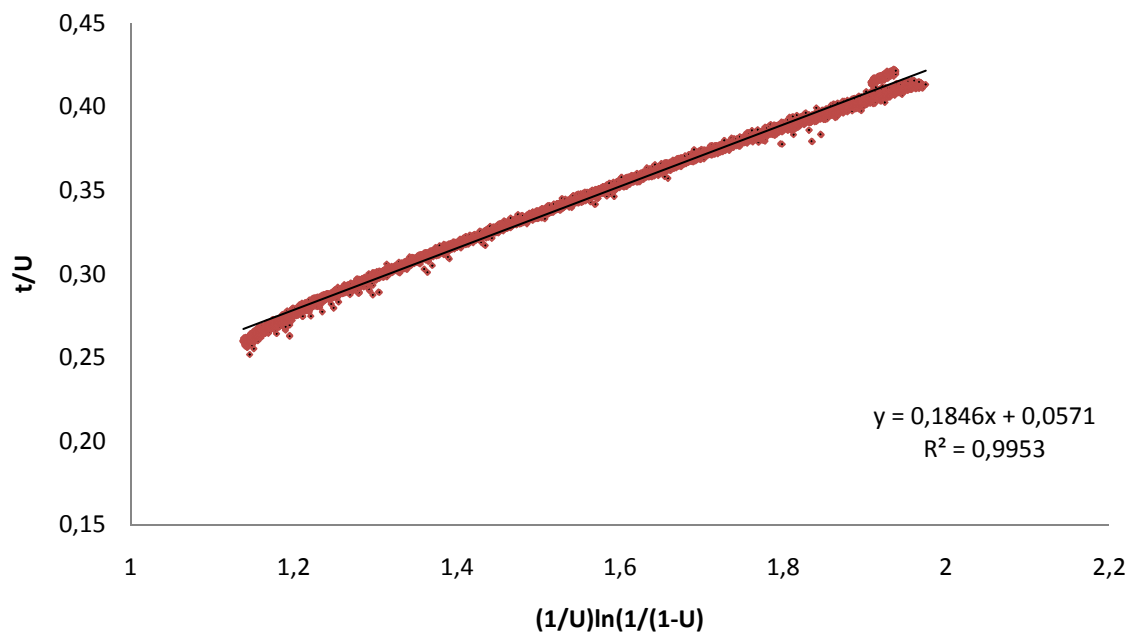


Abb. 62 Auftragung der integrierten M.-M.-Gleichung der L-DOPA-Umsetzung bei 25 °C.

Aus der Steigung der Trendlinie und dem Achsenabschnitt wurden die v_{max} -, v_{max}^E -und K_m - Werte berechnet. (v_{max}^E =Maximale Reaktionsgeschwindigkeit pro Enzymkonzentration.)

v_{max} =	[L-DOPA] _{t=0} /Achsenabschnitt	
	124,343	mmol/L*h
	0,1243	mol/L*h
v_{max}^E =	0,1243 / 1,5= 0,0828 mol /Lh	
K_M =	Steigung*Vmax	
	22,95	mmol/L
	0,02295	mol/L

Tabelle 14 v_{max} und K_M Werte von 7,01 mmol/L L-DOPA bei 25°C.

5.5.3.2 II. Experiment zur Oxidation von L-DOPA im Batch Prozess

5 ml 10,1425 mmol L-DOPA wurden mit 4,5 ml 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ –Lösung in einen 50 ml Glaskolben eingefüllt und mit einem Magnetrührer vermischt. Die Reaktion wurde mit 500 µl Lipase gestartet.

Damit sollen die berechneten v_{max} -, v_{max}^E -und K_m – Werte vom I. und II. Batch-Experiment verglichen werden.

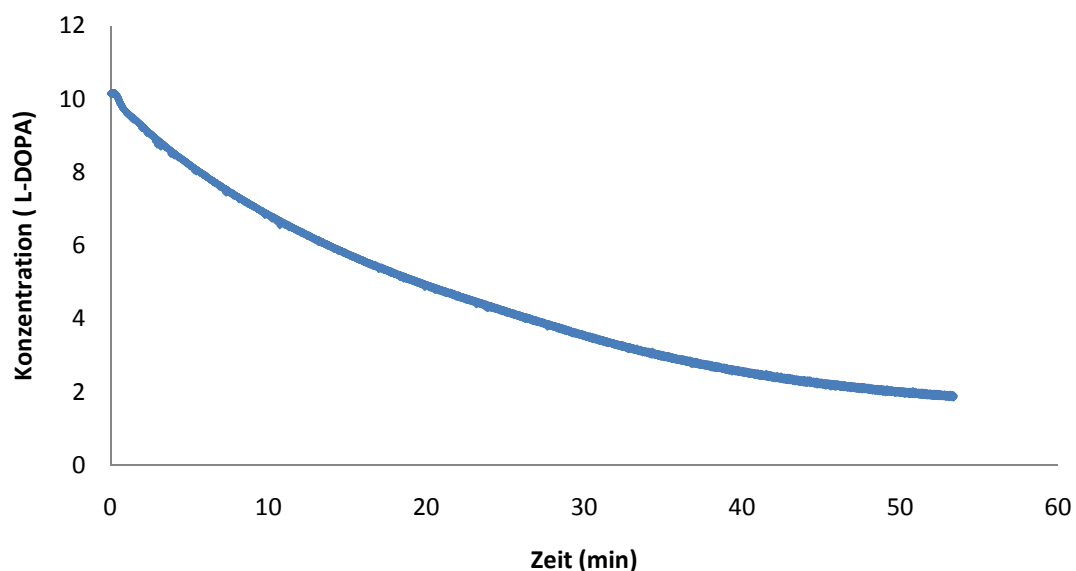


Abb. 63 Zeitlicher Verlauf der Konzentration von L-DOPA bei 25 °C.

In der Abbildung 63 ist der Konzentrationsverlauf von L-DOPA bei 25 °C dargestellt.

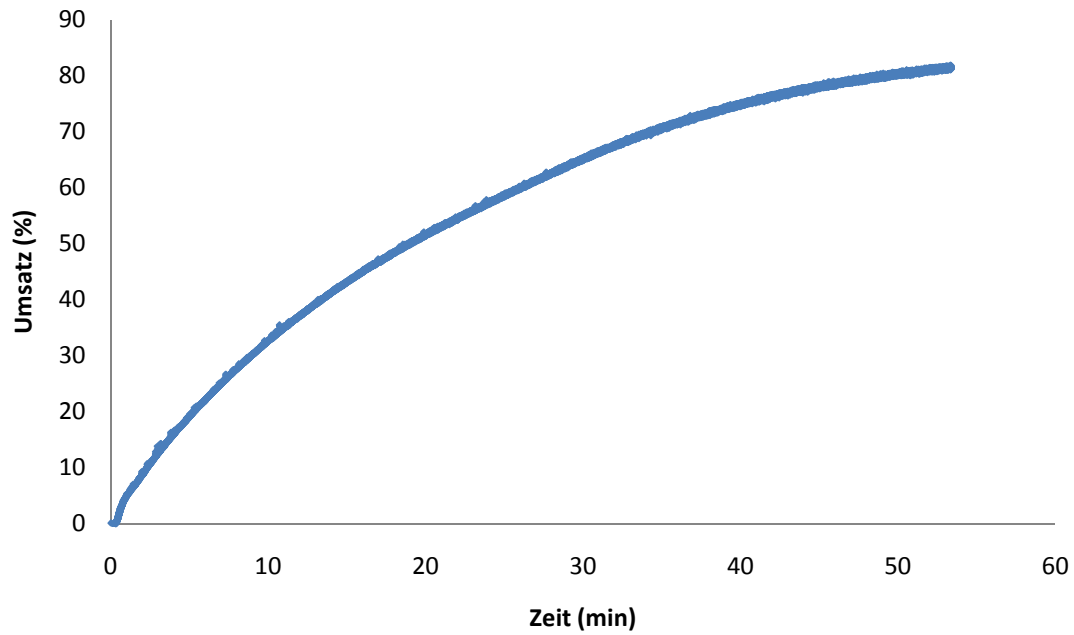


Abb. 64 Zeitlicher Verlauf des Umsatzes von L-DOPA bei 25°C.

In Abb.64 ist zu erkennen, dass nach 50 Minuten der Umsatz auf 81,23 % ansteigt.

Unter Verwendung der integrierten Michaelis-Menten-Gleichung wurden v_{max} , v_{max}^E und K_m kalkuliert (Abb. 65).

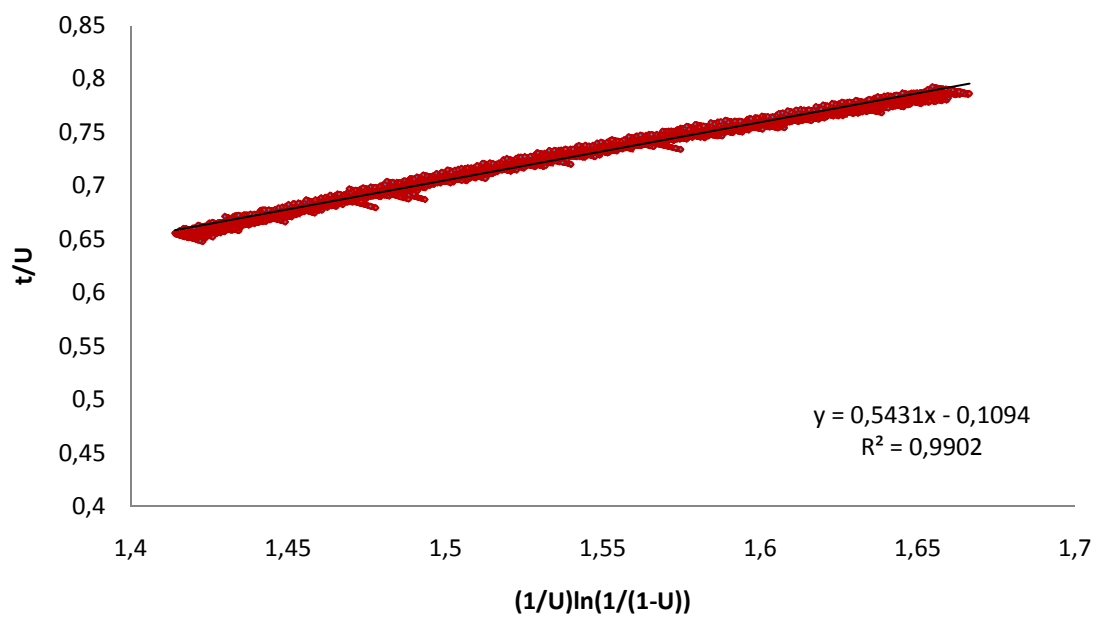


Abb. 65 v_{max} und K_M Werte von 10,1425 mmol/L L-DOPA bei 25°C.

Aus der Steigung der Trendlinie und dem Achsenabschnitt wurden die v_{max} -, v_{max}^E - und K_M - Werte berechnet.

$v_{max} =$	$[L-DOPA]_{t=0} / \text{Achsenabschnitt}$	
	92,71	mmol/L*h
	0,09271	mol/L*h
$v_{max}^E =$	$0,09271 / 1,5 = 0,0618$	mol /Lh
$K_M =$	$\text{Steigung} * V_{max}$	
	50,35	mmol/L
	0,05035	mol/L

Tabelle 15 v_{max} und K_M Werte von 10,1425 mmol/L L-DOPA bei 25°C.

5.5.4 Die Oxidation von L-DOPA im Fed Batch Prozess

5.5.4.1 I. Puls Experimente

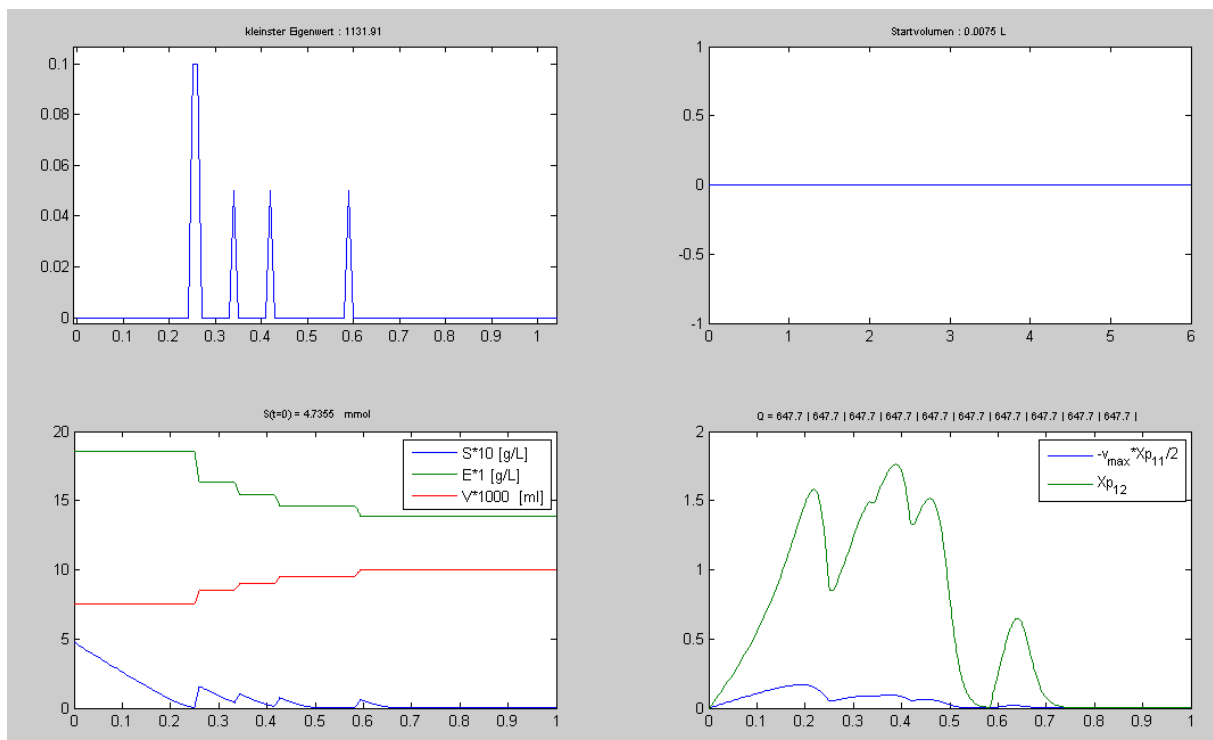


Abb. 66 Durch Matlab berechnete ideale Reaktionsbedingungen für das I. Puls Experiment zur Oxidation von L-DOPA

Die Reaktion fängt mit 4,733 mmol L-DOPA und einem Gesamtvolumen von 7,5 ml an. Gesamtpulsvolumen beträgt 2,5 ml und 14,2 mmol/L

Nach 15, 20, 25 und 35 Minuten wurden die Pulse von je 500 μl und 14,2 mmol/L in die Reaktionsmischung hinzugefügt. Das Volumen des ersten Pulses (1. + 2. Puls) beträgt 1 ml und das Volumen der folgenden Pulse beträgt 0,5 ml.

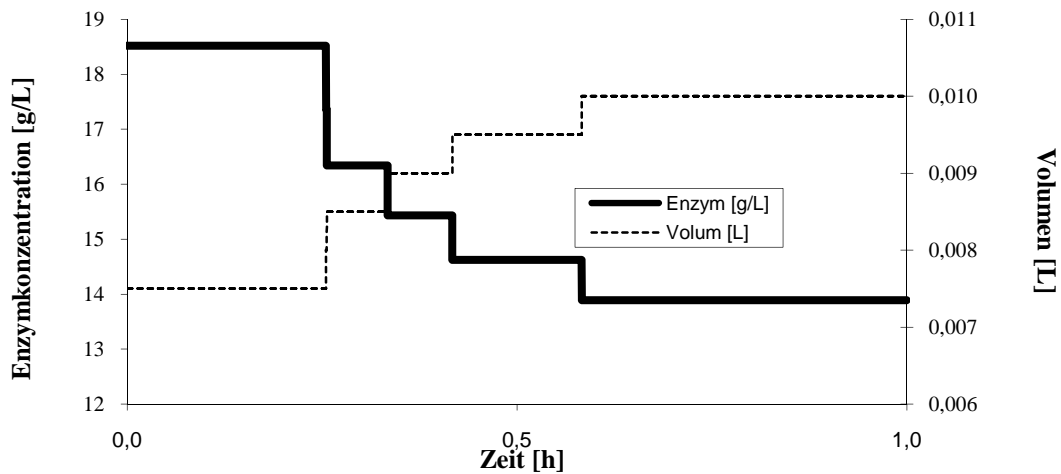


Abb.67 Zeitlicher Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens vom L-DOPA I. Puls Exp.

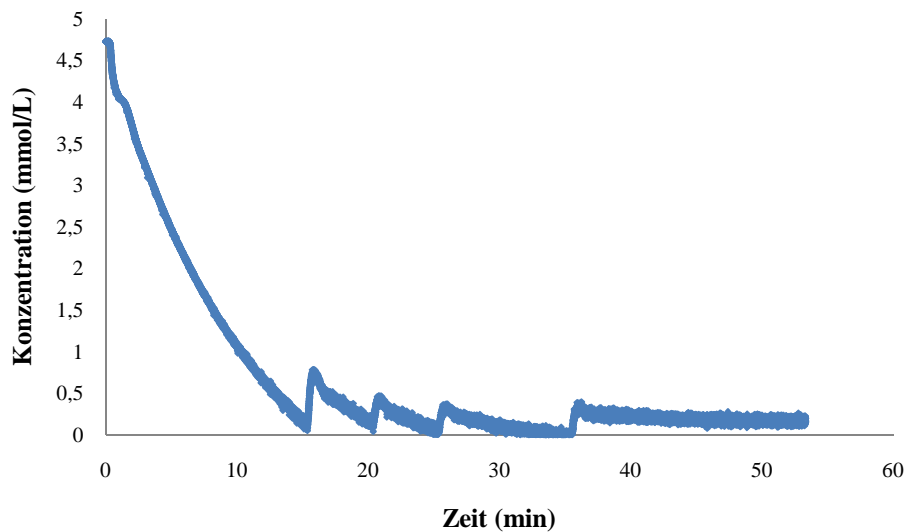


Abb.68 Zeitlicher Konzentrationsverlauf von L-DOPA beim Fed-Batch-Prozess I. Puls Experiment.

Die Parameter v_{\max}^E und K_m von diesem Fed-Batch-Prozess wurde durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet.

v_{\max}	v_{\max}^E	K_m
0,109 mol/Lh	$0,109/5 = 0,218 \text{ mol/Lh}$	0,35 mol/L

Tabelle 16 Werte von v_{\max} und K_m von L-DOPA durch kleinste Fehlerquadrate I Puls Exp. bei 25 °C.

5.5.4.2 II. Puls Experiment zur Oxidation von L-DOPA

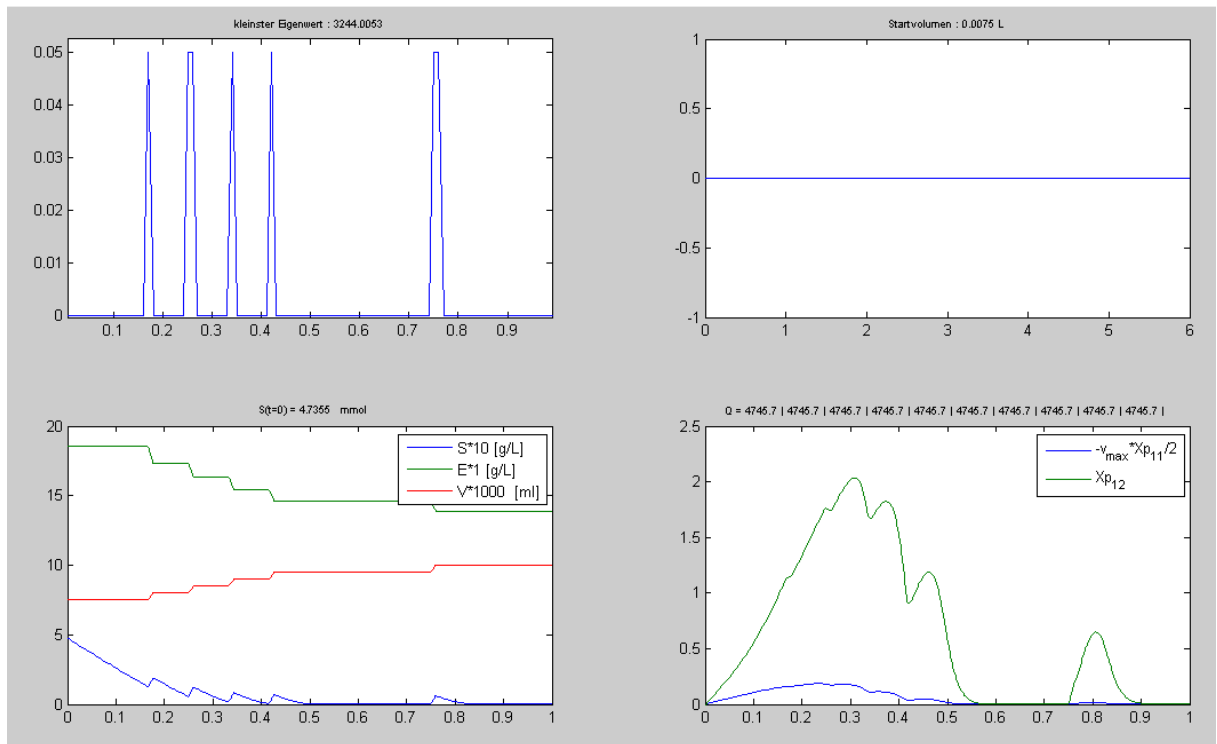


Abb. 69 Durch Matlab berechnete ideale Reaktionsbedingungen für das II. Puls Experiment von L-DOPA.

Die Reaktion fängt mit 4,733 mmol L-DOPA und einem Gesamtvolumen von 7,5 ml an. Das Gesamtpulsvolumen beträgt 2,5 ml.

Die Pulszeiten beim II. Puls Experiment betragen 10, 15, 20, 25 und 45 Minuten. Die in die Reaktionsmischung hinzugefügte Pulsmenge beträgt jeweils 500 µl und 14,02 mmol/L.

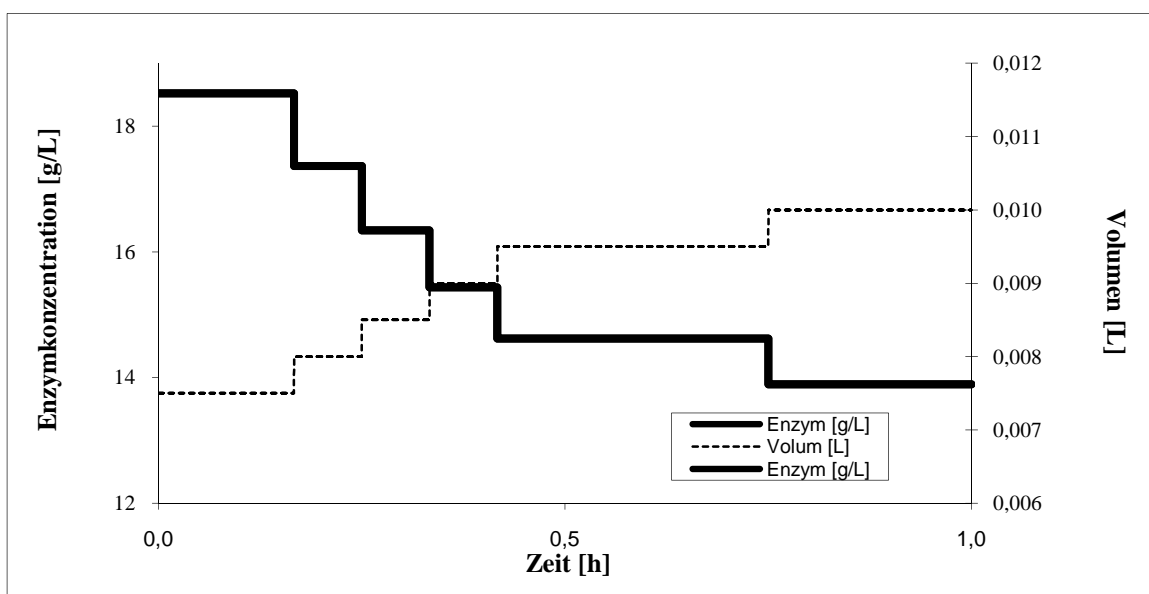


Abb.70 Zeitlicher Verlauf der Enzymkonzentration und des Reaktionsvolumens von L-DOPA II. Puls Exp.

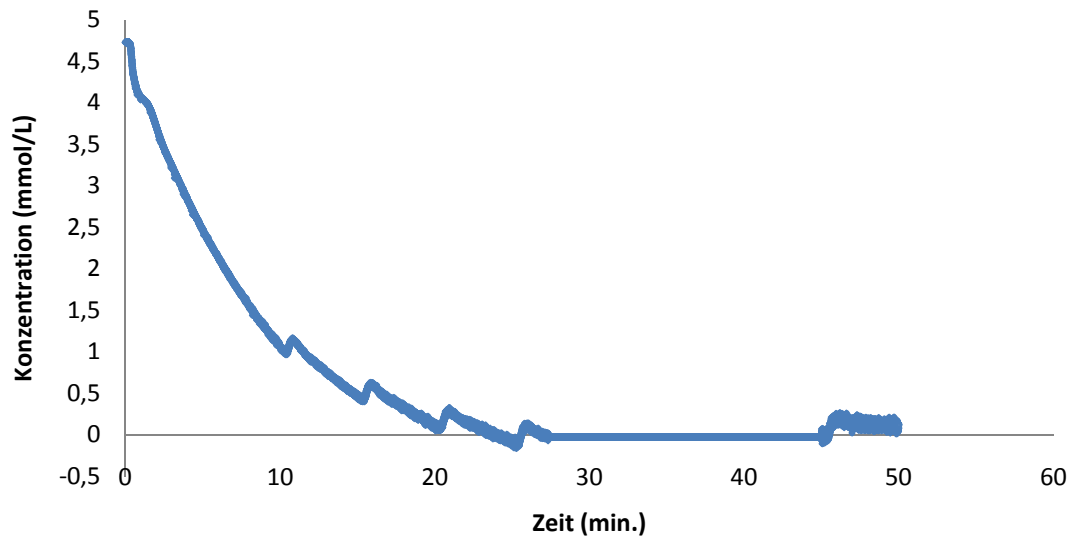


Abb. 71 Zeitlicher Konzentrationsverlauf von L-DOPA beim Fed-Batch-Prozess II. Puls Experiment.

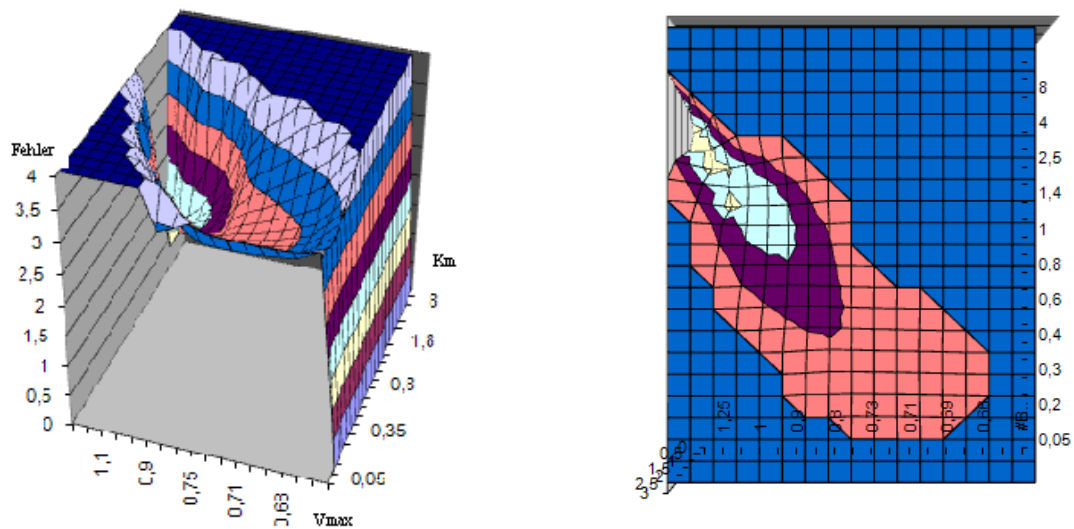


Abb. 72 Ansicht von v_{max} , K_m und Fehler Rechnungen vom L-DOPA im Fed-Batch Prozess II. Versuch.

Die Parameter v_{max}^E und K_m von diesem Batch-Prozess wurden durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnet.

v_{max}	v_{max}^E	K_m	Fehler
2,75 mmol/Lh	$2,75/5 = 0,55$ mmol/Lh	8 mmol/L	0,54131

Tabelle 17 Werte von v_{max} und K_m von L-DOPA durch kleinste Fehlerquadrate II Puls Exp. bei 25 °C.

	K_m mol/L	v_{\max} mol/Lh	Fehler
I. Batch-Prozess integrierte M-M-Gleichung	0,02295	0,1243	
1. Plus EXP von L-DOPA	0,035	0,109	0,28952
2. Plus EXP von L-DOPA	2,75	8	0,54131

Tabelle.18 Gesamte K_m und v_{\max} -Werte vom L-DOPA des Puls-Experiments.

Tabelle 18 zeigt, dass die K_m und v_{\max} Werte einen größeren Unterschied besitzen. Diese Unterschiede kommen höchstwahrscheinlich dadurch zustande, dass die Untersuchung mit kleinen Konzentrationen (mmol) den Fehler vergrößert.

5.5.5 Zusammenfassung zur Oxidation von L-DOPA im Fed-Batch-Prozess

Das L-DOPA Experiment wurde in einem sehr kleinen Konzentrationsbereich (mmol/l) durchgeführt. Der UV-Spektrometer ist für Untersuchungen in mol Bereichen ungeeignet, weil die Erhöhung der Konzentration zu einer Sättigung bei der gemessenen Wellenlänge und hierdurch zu Messfehlern führt.

Im L-DOPA Experiment wurde deutlich, dass die Untersuchung mit kleinen Konzentrationen (mmol) den Fehler vergrößert.

Dieses Experiment wurde mit einem größeren Reaktionsanfangsvolumen (7,5ml) begonnen. Damit die Reaktionslösungen in diesem System umlaufen, werden mindestens 5 ml der Reaktionslösung benötigt.

Die Ideallösung könnte erlangt werden durch die Verwendung eines kleineren Anfangsvolumens und eines größeren Pulsvolumens. Diese Reihenfolge konnte aufgrund in dieser Ausführung schon beschriebenen Problematik nicht eingehalten werden.

Zur Realisierung dieses Systems sollten folgende Punkte beachtet werden:

Die Reaktion des Enzyms sollte genau nach der Michaelis Menten Kinetik ablaufen.

Das Experiment sollte in großen Konzentrationen in mol/L Bereich durchgeführt werden.

Zur Durchführung des Experimentes sollte ein kleines Reaktionsanfangsvolumen, eine große Konzentration des Reaktionsanfangsvolumens und ein großes Pulsvolumen ausgewählt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Aragozzini**, F., Maconi, E., Potenza, D., and Scolastico, C. Enantioselective microbial reduction of monoesters of 1,3-dihydroxypropanone: Synthesis of (R) and (S)-1,2 - O-isopropylideneglycerol. *Synthesis*, vol.3, pp: 225-227,(1989)
- Arnold** V., Struktur-Wirkungsbeziehungen bei der enzymatischen Hydrolyse von Carbonsäureestern., Dissertation., Prozesswissenschaften der Technischen Universität Berlin., 2005
- Asanuma**, M., Miyazaki, I., and Ogawa, N. *Neurotox. Res.* vol. 5, pp: 165–176 (2003)
- Atkins** G. L. and Nimmo I. A., Comparison of Seven Methods for Fitting the Michaelis-Menten Equation., *Biochem. J.* vol. 149, pp: 775-777 (1975)
- Atkinson**, A.C. The usefulness of optimum experimental designs. *J. R. Stat. Soc. B* vol. 58 (1), pp: 59–76. (1996)
- Baltes**, M., Schneider, R., Sturm, C., Reuss, M., Optimal experimental design for parameter estimation in unstructured growth models. *Biotechnol. Progr.* vol. 10 (5), pp: 480–488. (1994)
- Barton**, M. J., Hamman, J. P., Fichter, K. C., Calton, G. J. Enzymatic resolution of (R, S)-2-(4-hydroxyphenoxy) propionic acid. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 12(8), pp: 577-583, (1990)
- Berglund** P., Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis., *Biomolecular Engineering.*, vol. 18, pp: 13-22 (2001)
- Berglund**, P. Controlling lipase enantioselectivity for organic synthesis. *Biomolecular Engineering*, vol. 18(1), pp: 13-22, (2007)
- Berlitz**, H. D., Grosch, W., Lehrbuch der Lebensmittelchemie., Springer Verlag (1992).
- Bezeau**, M., Endrenyi, L., Design of experiments for the precise estimation of dose–response parameters: the Hill equation. *J. Theor. Biol.* vol. 123, pp: 415–430. (1986)
- Bhatia**, S.K., Hajdu, J., Stereospecific synthesis of PAF analogues. *Tetrahedron Lett.*, vol.28, pp:1729 - 1732, (1987)
- Blumenstein**, J. J. Chiral Drugs: Regulatory Aspects, In: Chirality in Industry II., John Wiley & Sons, Weinheim, New York. (1997).
- Bornscheuer**, U., Schapöhler, S., Scheper, T., Schügerl, K. Influences of reaction conditions on the enantioselective transesterification using *Pseudomonas cepacia* lipase. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 2(10), pp: 1011-1014, (1991)
- Bornscheuer**, U., Stamatis, H., Xenakis, A., Yamane, T., Kolisis, F.N. A comparison of different strategies for lipase-catalyzed synthesis of partial glycerides. *Biotech. Lett.* vol. 16(7), pp: 697-702, (1994)
- Bornscheuer**, U., Herar, A., Capewell, A., Wendel, V., Kreye, L., Scheper, T., Voß, E., Wünsche, K., Meyer, H.H., Lipase-catalyzed Kinetic Resolution of 3-Hydroxy Esters: Optimization, Batch, and Continuous Reactions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 750(1), pp: 215–221, (1995)
- Bornscheuer**, U. T. und Kazlauskas, R. J., Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations., Weinheim, Wiley-VCH (1999)
- Bornscheuer**, U.T., Bessler, C., Srinivas, R., Krishna, S.H. Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology*, vol. 20(10), pp: 433-437, (2002)
- Bornscheuer**, U.T., Ordoñez, G.R., Hidalgo, A., et.al. Selectivity of lipases and esterases towards phenol esters. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 36(1-6), pp: 8-13, (2005)
- Boutelje**, J., Hjalmarsson, M., Hult, K., Lindbäck, M., Norin, T. Control of the stereoselectivity of pig liver esterase by different reaction conditions in the hydrolysis of cis-N-benzyl-2,5-bismethoxycarbonylpyrrolidine and structurally related diesters. *Bioorganic Chemistry*, vol. 16(4), pp: 364-375, (1988)
- Brady**, L. et al., A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* vol. 343: pp:767-770. (1990)
- Brockerhoff** H, Jensen RG (1974) In: Lipolytic enzymes. Academic Press, New York, pp 34–90
- Burkholder** WH. Sour skin, a bacterial rot of onion bulbs. *Phytopath*; vol. 40, pp: 115-117. (1950)

- Cabrera-Valladares** N., Martinez A., Pinero S., Lagunas-Munoz V. H., Tinoco R., *et.all.*, Expression of the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology* vol. 38, pp: 772–779 (2006).
- Cambillau**, C., van Tilbeurgh, H., Structure of hydrolases - lipases and cellulases. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, vol. 3. pp: 885-895.(1993)
- Capewell**, A., Wendel, V., Bornscheuer, U., Meyer, H. H., Scheper, T. Lipase-catalyzed kinetic resolution of 3-hydroxy esters in organic solvents and supercritical carbon dioxide. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 19, pp: 181-186, (1996)
- Chen**,C.S., Wu, S.H., Girdaukas, G., Sih, C.J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolution of enantiomers. 2. Enzyme-catalyzed esterifications in water-organic solvent biphasic systems *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 109(9), pp: 2812–2817, (1987)
- Chen**,C. SIH, C.J. Enantioselektive Biokatalyse in Organischen Solventien am Beispiel Lipase-katalysierte Reaktionen. *Angew. Chem.* vol. 101, pp: 711-724 (1996).
- Cipiciani**, A., Bellezza, F., Fringuelli, F., Silvestrini, M.G. Influence of pH and temperature on the enantioselectivity of propan-2-ol-treated *Candida rugosa* lipase in the kinetic resolution of (\pm)-4-acetoxy-[2, 2]-paracyclophane. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 12(16), pp: 2277-2281, (2001)
- Cleland**, W.W., Computer programmes for processing enzyme kinetic data, *Nature*, vol. 198, pp: 463–465. (1963)
- Cornish-Bowden** A, Parameter Estimating Procedures for the Michaelis--Menten Model., *J. theor. Biol.* vol. 153, pp: 437-440 (1991)
- Cornish-Bowden**, A., Fundamentals of Enzyme Kinetics. *Portland Press Ltd.* 2004.
- Crosby**, J. Synthesis of optically active compounds: A large scale perspective. *Tetrahedron*, vol.47(27), pp: 4789 – 4846,(1991)
- Cygler**, M., Schrag, J. D., Sussman, J. L., Harel, M., Silman, I., Gentry, M. K., Doctor, B. P. Relationship between sequence conservation and three-dimensional structure in a large family of esterases, lipases, and related proteins. *Protein Sci.* vol. 2, pp: 366-382 (1993)
- De Oliveira**, D., Di Luccio, M., Amroginski, C., De Oliveira, J.V., Optimization of enzyme production of biodiesel from castor oil in organic solvent medium. *Appl. Biochem. Biotechnol.* vol. 115, pp: 771–780. (2004)
- Derewenda**, Z. S., Derewenda, U., Dodson, G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.*, vol. 227 pp: 818-839. (1992).
- Derewenda**, U., Swenson, L., Green, R., Wei, Y., Yamaguchi, S., Joerger, R., Haas, M. J., Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng.* vol. 12, pp: 551-557. (1994)
- Dodson**, G. G., lawson, D. M., Winkler, F. K.. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday Discuss* pp: 95-105 (1992)
- Dowd** J. Riggs D., A Comparison of Estimates of Michaelis-Menten Kinetic Constants from Various Linear Transformations., *J. Biological Chemistry*, vol. 240 (2), pp:863-869, (1965)
- Duggleby**, R.G., Clarke, R.B. Experimental design for estimating the parameters of the Michaelis–Menten equation from progress curves of enzyme-catalyzed reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1080, pp: 231–236, (1991)
- Ema** T., Maeno S., Takaya Y., Sakai T., Utaka M. Significant effect of acyl groups on enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterifications. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 7(3), pp: 625-628, (1996)
- Ema**, T., Yamaguchi, K., Wakasa, Y., Yabe, A., Okada, R., Fukumoto, M., Yano, F., Korenaga, T., Utaka, M., Sakai,T. Transition-state models are useful for versatile biocatalysts: kinetics and thermodynamics of enantioselective acylations of secondary alcohols catalyzed by lipase and subtilisin. *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, vol. 22(3-4), pp: 181-192, (2003)
- Ema**, T. Rational strategies for highly enantioselective lipase-catalyzed kinetic resolutions of very bulky chiral compounds: substrate design and high-temperature biocatalysis. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15(18), pp: 2765-2770, (2004)
- Endrenyi**, L., Chan, F.-Y., Optimal design of experiments for the estimation of precise hyperbolic kinetic and binding parameters. *J. Theor. Biol.*, vol. 90, pp: 241–263. (1981)

- Espin J.C.**, Voraon R. at al., Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *Eur. J. Biochem.* vol. 267, pp: 1270-1279 (2000)
- Eyring**, H. The Activated Complex in Chemical Reactions. *J. Chem. Phys.*, vol. 3, pp: 107 – 115, (1935)
- Galínlio J. D.**, Pegafiel R., Varon R., Pedrero E., García-Carmona F., García-Canovas F., Kinetic study of the activation process of Frog epidermis pro-Tyrosinase by trypsin., *Int. J. Biochem.*, vol. 15 (5), pp. 633-637 (1983)
- Goodwin**, G.C., Payne, R.L., Dynamic System Identification: Experiment Design and Data Analysis. *Academic Press*, New York. 1977
- Goodwin**, G.C., Identification: experiment design. In: Singh, G(Ed.), *System and Control Encyclopedia*, vol. 4, pp. 2257–2267. (1987).
- Grochulski**, P., Li, Y., Schrag, J. D., Bouthillier, F., Smith, P., Harrison, D., Rubin, B., Cygler, M., Insight into interfacial activation from an open 'structure' of *Candida rugosa* lipase. *J. Biol. Chem.*, vol. 268, pp: 12843-12847. (1993)
- Gupta**, A.K., Kazlauskas, R.J. Substrate modification to increase the enantioselectivity of hydrolases. A route to optically-active cyclic allylic alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 4(5), pp: 879-888, (1993)
- Han P.**, Chen C., Zhang C., Song K.K., Zhou H.T., Chen Q.X. Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. *Food Chemistry*, vol. 107, pp: 797–803 (2008)
- Hedström**, G., Backlund, M., Slotte, J.P. Enantioselective synthesis of ibuprofen esters in AOT/isooctane microemulsions by *Candida cylindracea* lipase. *Biotechnol. Bioeng.* Vol. 42(5), pp: 618-624, (1993)
- Hernández-Fernández**, F.J, de los Ríos, A.P, Rubio, M.I, et.al. Enhancement of activity and selectivity in lipase-catalyzed transesterification in ionic liquids by the use of additives. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol.82(10),pp: 882-887, (2007)
- Hoffmann**, F., Posten, C., Rinas, U., Kinetic model of in vivo folding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* vol. 72, pp: 315–322. (2001)
- Holmberg**, E., Hult, K. Temperature as an enantioselective parameter in enzymatic resolutions of racemisch mixtures. *Biotechnology Letters*, vol. 13(5), pp: 323–326, (1991)
- Houde A**, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications: an overview. *Appl Biochem Biotechnol*, vol. 118(1–3), pp:155–70, (2004)
- Irimescu**, R., Saito, T., Kato, K. Enzymatic kinetic resolution of primary alcohols by direct esterification in solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 27(2-3), pp: 69-73, (2004)
- Jericevic Z.**, Kuster Z., Non-linear optimization of parameters in Michaelis-Menten kinetics., *CROATICA CHEMICA ACTA.*, vol. 78 (4), pp: 519-523 (2005)
- Jurczak**, J., Pikul, S., Bauer, T. (R)- and (S)- 2,3-O-Isopropylideneglyceraldehyde in Streoselective Synthesis. *Tetrahedron*, vol. 42(2), pp: 447 – 488, (1986)
- Kakkar**, T., Pak, Y., Mayersohn, M., Evaluation of a minimal experimental design for determination of enzyme kinetic parameters and inhibition mechanism. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* vol. 293 (3), pp: 861–869. (2000).
- Kawanami**, Y., Iizuna, N., Maekawa, K., Maekawa, K., et.al. Substituent effect on the enantioselectivity in lipase-catalyzed transesterification of trans-2, 5-disubstituted pyrrolidines. *Tetrahedron*, vol. 57(16), pp: 3349-3353, (2001)
- Khan M. T. H.**, Molecular design of tyrosinase inhibitors: A critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins., *Pure Appl. Chem.*, vol. 79(12), pp: 2277–2295, (2007)
- Knežević**, Z., Šiler-Marinković, S., L. Mojović: Kinetics of lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil in lecithin/isooctane reversed micelles. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 49(3), pp: 267-271, (1998)
- Knežević**, Z. D., Šiler-Marinković, S.S., Mojović, L.V. Immobilized Lipases as Practical Catalysts *APTEFF*, vol.35, pp: 151-164, (2004)
- Lee**, S. B.; Mitchell, D. T.; Trofin, L.; Nevanen, T. K.; Söderlund, H., Martin, C. R. Antibody-Based Bio-Nanotube Membranes for Enantiomeric Drug. *Separations Science*, 296(5576), pp: 2198 - 2200, (2002)

- Lerner, A. B. and Fitzpatrick, T. B.:** Bio-chemistry of melanin formation. *Physiol. Rev.*, vol. 30, pp: 91-123, (1950).
- Lindner P., Lindner O., Hitzmann B.,** Experimental design for optimal parameter estimation of an enzyme kinetic process based on the analysis of the Fisher information matrix. *Journal of Theoretical Biology* vol. 238, pp: 111–123, (2006)
- Lin, C.;** Hiraga, Y., Masaki, K.; Iefuji, H.; Ohkata, K. Temperature-dependence of enantioselectivity and desymmetrization in the acetylation of 2-mono- and 2, 2-di-substituted 1, 3-propanediols by a novel lipase isolated from the yeast *Cryptococcus* spp. S-2. *Biocatalysis and Biotransformation*, vol. 24(5), pp: 390–395, (2006)
- Lineweaver H., Burk D.,** The Determination of Enzyme Dissociation Constants, *J. Am. Chem. Soc.*, , vol.56 (3), pp: 658-666, (1934)
- Lokotsch, W., Fritsche, K., Syltatk, Ch.,** Resolution of d,l-menthol by interesterification with triacetin using the free and immobilized lipase of *Candida cylindracea*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 31(5-6), pp:467-472, (1989)
- Lortie, R.** Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnology Advances*, vol. 15(1), pp: 1-15, (1997)
- Lottspeich F., Zorbas H.,** Bioanalytik. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 49 ff. (1998)
- Lundh, M., Nordin, O., Hedenström, E., Högborg, H.E.** Enzyme catalysed irreversible transesterifications with vinyl acetate. Are they really irreversible? *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 6 (9), pp: 2237-2244, (1995)
- Maconi. E., Gualandris, R., and Aragozzini, F.** Hydrolytic microbial resolution of 1,2-O-isopropylidenediglycerol: Improvements by using esters with homologous fatty acids. *Biotechnol. Lett.*, vol. 12, pp: 415-418, (1990)
- Majumder, Abir B, Shah, Shweta, Gupta, Munishwar N.** Enantioselective transacetylation of (R, S)-beta-citronellol by propanol rinsed immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Chem Cent J.*, vol. 1, pp: 10, (2007)
- Markus M. Hess B.,** The Analysis of kinetic Data in Biochemistry a Critical evaluation of Methods., *FEBS LETTERS*, vol. 63 (2), pp: 225-230 (1976)
- Mason, H. S. :** The **chemistry** of melanin. III. Mechanism of the oxidation of dihydroxy- phenylalanine by tyrosinase. *J. biol. Chem.* vol. 172, pp: **83--99** (1948). .
- Matyska L. and J. Kovar.,** Comparison of several non-linear-regression methods for fitting the Michaelis-Menten equation. , *Biochem. J.*, vol. 231, pp: 171-177 (Printed in Great Britain) (1985)
- McCarthy, T. J.;** Witz, G. Strukture-activity relationships in the hydrolysis of acrylate and methacrylate esters by carboxylesterase *in vitro*. *Toxicology*, vol. 116, pp: 153-158 (1997),
- McMahon A. M., Doyle E.M., Brooks S., O'Connor K. E.,** Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6., *Enzyme and Microbial Technology.*, vol. 40, pp: 1435–1441 (2007).
- Meyring, M., Chankvetadze, B. and Blaschke, G.,** Simultaneous Separation and Enantioseparation of Thalidomide and its Hydroxylated Metabolites using High-performance Liquid Chromatography in Common-size Columns, Capillary Liquid Chromatography and Nonaqueous Capillary Electrochromatography. *J. of Chromatogr. A*, 876, 157 (2000).
- Michaelis, L. und Menten, M.,** *LBiochem.* vol. .49, pp: 333-369. (1913)
- Miyako, E.,** Highly Enantioselective Separation Using a Supported Liquid Membrane Encapsulating Surfactant-Enzyme Complex. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 126(28), pp: 8622 - 8623, (2004)
- Miyazawa T., Minowa H., Miyamoto, T. Imagawa K., Yanagihara R. and Yamada T.,** Resolution of non-protein amino acids via microbial protease-catalyzed ester hydrolysis: marked enhancement of enantioselectivity by the use of esters with longer alkyl chains and at low temperature., *Tetrahedron: symmetry*, vol. 8 (3), pp. 367-370. (1997)
- Miyazawa T., Imagawa K., Yanagihara R., and Yamada T.,** Marked dependence on temperature of enantioselectivity in the *Aspergillus oryzae* protease-catalyzed hydrolysis of amino acid esters., *Biotechnology Techniques*, vol 11 (12), pp. 931–933, (1998),
- Miyawaza, T., Kurita, S., Shimaoka, M., Ueki, S., Yamada, T.** Resolution of Racemic Carboxylic Acids via the Lipase-Catalyzed Irreversible Transesterification of Vinyl Esters. *Chirality*, vol. 11, pp: 554–560, (1999)

- Mojović, L., Šiler-Marinković, S., Kukić, G., Vunjak-Novaković, G.** Rhizopus arrhizus lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 15(5), pp: 438–443, (1993)
- Molinari, F., Brenna, O., Valenti, M. and Aragozzini, F.** Isolation of a novel carboxylesterase from *Bacillus coagulans* with high enantioselectivity toward racemisch esters of 1, 2-O-isopropylideneglycerol. *Enzyme Microb Technol*, vol.19(7), pp:551–556, (1996)
- Molinari, F.,G.**, Enzymatic synthesis of (S)-1,2-O-isopropylidene glycerol. European Patent EP1413627 (2003)
- Molinari, F., Romano, D., Gandolfi, R., Kroppenstedt, R.M., Marinelli, F.** Newly isolated *Streptomyces* spp. as enantioselective biocatalysts: hydrolysis of 1,2-O-isopropylidene glycerol racemisch esters. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), p. 960, 2005
- Monterde, M. I., Brieva, R., Sánchez, V.M., Bayod, M., Gotor, V.** Enzymatic resolution of the chiral inductor 2-methoxy-2-phenylethanol *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 13(10), pp: 1091-1096, (2002)
- Munack, A.,** Optimization of sampling. In: Schu" gerl, K. (Ed.), *Biotechnology*, vol 4, pp. 251–264. (1991)
- Munack, A., Posten, C.,** Optimale Versuchsplanung zur modellierung des wachstums von pflanzenzellen in submerskultur. *Automatisierungstechnik*, vol. 37, pp: 55–65. (1989).
- Murphy, E.F., Gilmour, S.G., Crabbe, M.J.C.,** Effective experimental design: enzyme kinetics in the bioinformatics era.*Discovery Today* vol. 7, pp: 187–191. (2002).
- Murphy, E.F., Gilmour, S.G., Crabbe, M.J.C.,** Efficient and accurate experimental design for enzyme kinetics: Bayesian studies reveal a systematic approach. *J. Biochem. Biophys.* vol. 55, pp: 155–178. (2003)
- Murphy, E.F., Gilmour, S.G., Crabbe, M.J.C.,** Efficient and cost-effective experimental determination of kinetic constants and data: the success of a Bayesian systematic approach to drug transport, receptor binding, continuous culture and cell transport kinetics. *FEBS Lett.* 556, 193–198. (2004)
- Oetting, W. S.** *Pigment Cell Res.* vol. 13, pp:320–325 (2000)
- Ollis, D. L., Cheah, D., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S., Harel, M., Remington, S., Silman, I.** The a/b hydrolase fold. *Protein Eng.*vol. 5, pp: 197-211. (1992).
- Orrenius C., van Heusden C.et all.**Simple conformation space search Protocols for the evalution of enantioselectivity of lipases., *Protein Engineering* vol. 11 (12), pp :1147-1153 (1998)
- Ottosson,J., Fransson,L., Hult,K.** Substrate entropy in enzyme enantioselectivity: An experimental and molecular modeling study of a lipase. *Protein Sci.*, vol. 11, pp: 1462–1471, (2002)
- Overbeeke A. P. L., S. Orrenius C., Jongejan J. A.,** Enthalpic and entropic contributions to lipase enantioselectivity, *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 93, pp: 81–93, (1998).
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C. R., Nigam P., Krieger N., Soccol,V. T.** The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, Vol.29 (2), pp: 119 – 131, 1999
- Parmar, V.S., Prasad, A.K., Singh, P.K., Gupta, S.** Lipase-catalysed transesterifications using 2, 2, 2-trifluoroethyl butyrate: Effect of temperature on rate of reaction and enantioselectivity. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 3(11), pp: 1395-1398, (1992)
- Peters, U., Bankova, W., Welzel, P.** Platelet activation factor synthetic studies. *Tetrahedron*, vol.43, pp: 3803 - 3816 , (1987)
- Pham, V.T., Phillips, R.S. and Ljungdahl, Lars G.,** Temperature-Dependent Enantiospecificity of Secondary Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter ethanolicus*. *J. Am. Chem. Soc.* vol. 111, pp: 1935-1936 (1989).
- Pham, V.T., Phillips, R.S.** Effects of Substrate Structure and Temperature on the Stereospecificity of Secondary Alcohol Dehydrogenase from *Thermoanaerobacter et hanolicus*. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 112, pp: 3629-3632, (1990)
- Phillips, R. S.** Temperature modulation of the stereochemistry of enzymatic catalysis: prospects for exploitation *TIBTECH*, vol. 14, pp: 13–16, (1996)
- Pietta, P., Manera, E. and Ceva, P.,** Purity Assay of Ketoprofen by Highperformance Liquid Chromatography,"*J. Chromatogr.*, vol. 387,pp: 525 - 527, (1987)
- Pukelsheim, F.** Optimal Design of Experiments. Wiley, New York. , 1993
- Raper, H.S.,** The Aerobic Oxidases., *Physiol. Rev.*,vol. 8, pp: 245-258 (1928)

- Rasor, J. P., Voss, E.** Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Applied Catalysis A: General*, vol. 221(1-2), pp: 145-158, (2001)
- Rathi, P., Saxena, R.K., Gupta, R.** A novel alkaline lipase from *Burkholderia cepacia* for detergent formulation. *Process Biochemistry*, vol. 37(2), pp: 187-192, (2001)
- Reimond J., Prvan R.,** A Simulation Study on Designing Experiments to Measure the K_m of Michaelis-Menten Kinetics Curves. *J. theor. Biol.*, vol. 178, pp: 239-254 (1996)
- Ritchie, R., Prvan, T.,** A simulation study on designing experiments to measure the K_m of Michaelis-Menten kinetics curves. *J. Theor. Biol.* 178, 239–254. (1996)
- Sakai, T., Kawabata, I., Kishimoto, T., Ema, T., and Utaka, M.** Enhancement of the Enantioselectivity in Lipase-Catalyzed Kinetic Resolutions of 3-Phenyl-2H-azirine-2-methanol by Lowering the Temperature to -40 C. *J. Org. Chem.*, vol. 62, pp: 4906–4907, (1997).
- Sakai, T., Kishimoto, Y., Tanaka, Y., Ema, T., Utaka, M.** Low -Temperature Method for Enhancement of Enantioselectivity in the Lipase-Catalyzed Kinetic Resolutions of Solketal and Some Chiral Alcohols. *Tetrahedron Lett.*, vol. 39, pp: 7881–7884, (1998)
- Sakai, T., Hayashi, K., Yano, F., Takami, M., Ino, M., Korenaga, T., Ema, T.** Enhancement of the Efficiency of the Low Temperature Method for Kinetic Resolution of Primary Alcohols by Optimizing the Organic Bridges in Porous Ceramic-Immobilized Lipase. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, vol. 76, pp: 1441–1446, (2003)
- Sakai, T., Matsuda, A., Tanaka, Y., Korenaga, T., Ema, T.** The effect of temperature on the lipase-catalyzed asymmetric protonation of 1-acetoxy-2-methylcyclohexene giving (R)-2-methylcyclohexanone. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15(12), pp: 1929-1932, (2004)
- Sakai, T.** Low-temperature method' for a dramatic improvement in enantioselectivity in lipase-catalyzed reactions. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 15(18), pp: 2749-2756, (2004-1)
- Saltelli, A., K. Chan und E.M. Scott:** Sensitivity Analysis. In: Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, 2000.
- Sandoval, G., Marty, A.** Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 40(3), pp: 390-393, (2007)
- Schulz T., Pleiss J., Schmid R.D.:** Stereoselectivity of *Pseudomonas cepacia* lipase toward secondary alcohols: a quantitative model. *Protein Sci*, vol. 9; pp. 1053-1062 (2000)
- Secundo, F., Ottolina, G., Riva, S., Carrea, G.** The enantioselectivity of lipase PS in chlorinated solvents increases as a function of substrate conversion. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 8(13), pp: 2167-2173, (1997)
- Sih, C.J., Chen, CS.** Microbial Asymmetric Catalysis - Enantioselective Reduction of Ketones. *Angewandte Chemie International Edition in English*, vol. 23(8), pp: 570-578, (1984)
- Solomon, E. I., Sundaram, U. M., and Machonkin, T. E.** *Chem. Rev.* vol. 96, pp: 2563–2606 (1996)
- Solano-Munoz F., Penafiel R. and Galindo J. D.,** An electrometric method for the determination of tyrosinase activity., *Biochem, J*, vol. 229, pp: 573-578. (1985)
- Stinson, S.C.** Counting on chiral drugs. *Chem Engineering News*, vol.76(38),pp: 1-136, (1998)
- Stinson, S.C.** Chiral drugs. *Chem Engineering News*, vol.78(43), pp: 55 -78, (2000)
- Stork, G., Takahasi, T.,** Chiral synthesis of prostaglandins (PGE1) from D-glyceraldehyde. *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 99, pp 1275 – 1276, (1977)
- Straathof, A.J.J., Jongejan, J.A.** The enantiomeric ratio: origin, determination and prediction. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 21(8), pp: 559-571, (1997)
- Stryer, L.** Biochemie. Spektrum, Akademischer Verlag GmbH. Heidelberg. pp:235-237, (1991).
- Syddall, M.T., Paul, G.C., Kent, C.A.,** 1998. Improving the estimation of parameters of penicillin fermentation models. Preprints of the Seventh International Conference on Computer Applications in Biotechnology, Osaka, Japan, , pp. 23–28. (31 May–4 June 1998)
- Takors, R., Wiechert, W., Weuster-Botz, D.,** Experimental design for the identification of macroscopic models and model discrimination. *Biotechnol. Bioeng.* vol. 65, pp: 564–576. (1997)

Tservistas M., Untersuchungen zum Einsatz von überkritischem kohlendioxid als Medium für biokatalysierte Reaktionen. "Dissertation", Institut für Technische Chemie, Universität Hannover (1997).

Tucker, G.T. Chiral switches. *Lancet*, vol.355(9209),pp: 1085-1087, (2000)

Urakami T, Ito-Yoshida C, Araki H, Kijima T, Suzuki K-I, Komagata K. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol*, vol. 44, pp: 235-245. (1994)

Ursing JB, Rosselló-Mora RA, García-Valdés E, Lalucat J. Taxonomic note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *Int J Syst Bacteriol*; vol. 45, pp: 604. (1995)

Wang Q., Qiu L., Chen X., Song K.K., Shi Y. and Chen Q., Inhibitory effects of phloridzin dihydrate on the activity of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase., *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 15, pp: 1568–1571 (2007).

Wilkinson G. N., Statistical Estimations in Enzyme Kinetics., *Biochem. J.* vol. 80, pp: 324-332 (1961)

Winkler, F. K., D'Arcy, A., Hunziker, W. Structure of human pancreatic lipase., *Nature*, vol. 343, pp: 771-774. (1990).

Wu, S.T., Lin, L.P., Application of response surface methodology to optimize docosahexaenoic acid production by *Schizochytrium* sp S31. *J. Food Biochem.* vol. 27 (2), pp: 127–139. (2003)

Xie J.J, Song K.K., Qiu L., He Q., Huang H., Xi Chen Q., Inhibitory effects of substrate analogues on enzyme activity and substrate specificities of mushroom tyrosinase., *Food Chemistry* vol. 103, pp: 1075–1079 (2007)

Xu, Y., Stokes, A. H., Roskoski, R. J., and Vrana, K. E. *J. Neurosci. Res.* vol. 54, pp: 691–697(1998)

Xue C. B., Zhang L., Luo W. C., Xie X. Y., Jiangc L., and Xiao T., 3D-QSAR and molecular docking studies of benzaldehyde thiosemicarbazone, benzaldehyde, benzoic acid, and their derivatives as phenoloxidase inhibitors., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* vol. 15, pp: 2006–2015 (2007)

Yabuuchi E, Kosako Y, Oyaizu H, Yano I, Hotta H, Hashimoto Y, Ezaki T, Arakawa M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol*; vol.36, pp: 1251-1275. (1992)

Yang, H., Jönsson, Å., Wehtje, E., Adlercreutz, P., Mattiasson, B.
The enantiomeric purity of alcohols formed by enzymatic reduction of ketones can be improved by optimisation of the temperature and by using a high co-substrate concentration. *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1336, pp. 51–58, (1997)

Yasuyuki M., Takanori K. et al., Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis., *J. Biological chemistry*, vol. 281(13), pp. 8981–8990 (2006)

Yasufuku, Y., Ueji, S.T.M., Effect of Temperature on Lipase-catalyzed Esterification in Organic Solvent. *Biotechnol. Lett.*, vol. 17(12), pp: 1311–1316, (1995)

Yasufuku, Y., Ueji, S. Improvement (5-fold) of enantioselectivity for lipase-catalyzed esterification of a bulky substrate at 57°C in organic solvent. *Biotechnology Techniques*, vol. 10(8), pp: 625-628, (1996)

Yasufuku, Y., Ueji, S.-ichi. High Temperature-Induced High Enantioselectivity of Lipase for Esterifications of 2-Phenoxypropionic Acids in Organic Solvent. *Bioorganic Chemistry*, vol. 25(2), pp: 88-99, (1997)

Zahao N, Qu C, Wang E, Chen W. Phylogenetic evidence for the transfer of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme et al. 1960) to the genus *Burkholderia* as *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al. 1960) comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*; vol. 45, pp: 600-603. (1995)

Zaks, A.,Dodds, D.R.:

Application of biocatalysts and biotransformations to the synthesis of pharmaceuticals. *Drug Discovery Today*, vol. 2(12), pp: 513-531, (1997)

Zanoni, G., Agnelli, F., Meriggi, A., Vidari, G. Enantioselective syntheses of isoprostane and iridoid lactones intermediates by enzymatic transesterification. *Tetrahedron: Asymmetry*, vol. 12(12), pp: 1779-1784, (2001)

Zuegg, J., Hönig, H., Schrag, J. D., Cygler, M., Selectivity of lipases: Conformational analysis of suggested intermediates in ester hydrolysis of chiral primary and secondary alcohols. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 3(1-4), pp: 83-98, (1997)

7 Anhang

7.1 Gaschromatographien

An den für die vorliegende Arbeit verwendeten Gaschromatographen GC-14A (Shimadzu) ist ein Terminal, C-R4AX CHROMATOPAC, der gleichen Firma angeschlossen. Die Säule besteht aus FS-Hydrodex[®] β -3P (Heptakis(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)- β -cyclodextrin) mit einer Länge von 25 m und einem Innendurchmesser von 0,25 mm (Macherey-Nagel).

7.1.1 Geräteeinstellungen:

Trärgas H ₂	1,2	bar
Synthetische Luft	0,65	bar
Make-up Gas	0,5	bar
Injektortemperatur	180	°C
Detektortemperatur	250	°C
Injektionsvolumen	1	μ l

7.1.2 Retentionszeiten

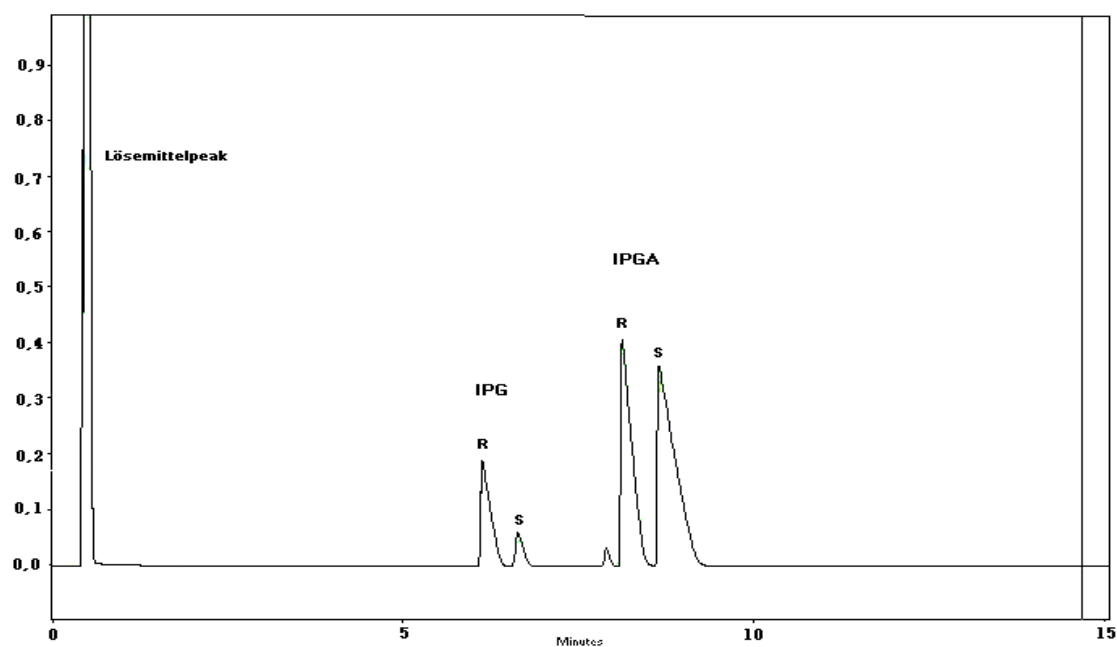


Abb.73 Gaschromatogramm eines Reaktionsansatzes

(R)-L-IPG	6, 13 min
(S)-D-IPG	6, 45 min
(R)-L-IPGA	8, 24 min
(S)-D-IPGA	8, 83 min

7.2 Chemikalien

Pseudomonas cepacia Firma Fluka

Tyrosinase (EC 1.14.18.1) vom Pilz ist ein Produkt der Sigma. (Die spezifische Tätigkeit des Enzyms war 6680 U/mg.)

Vinylacetat Merck

L-, D-3,4-dihydroxyphenylalanine. (L- D-DOPA) Aldrich

(S)-2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol, 1,2,0-ISOPROPYLIDENGLYCERIN oder Solketal Aldrich

NaH₂PO₄.H₂O Natrium dihydrogen phosphate Monohydrate Fluka

7.3 Geräte bei der Probe Aufarbeitung

Vortexer Heidopf

Zentrifuge Eppendorf

7.4 Fehlerbetrachtungen

Die Fehlerbetrachtung beinhaltet die Abschätzung der Fehler einzelner Messmethoden. Es erfolgt die quantitative Abschätzung der Einflussfaktoren auf die Messergebnisse der Experimente.

- ✓ **Natürliche Schwankung des biologischen Materials**
- ✓ **Temperatur**
- ✓ **pH-Wert**
- ✓ **Substratanfangskonzentration**
- ✓ **Messunsicherheit der gaschromatographischen Analyse mit internem Standard**
- ✓ **Reproduzierbarkeit der angewendeten Prüfmittel**

Die Gerätetoleranzen betragen für:
Analysenwaage: ± 0,00001 g

[Arnold-2005]

7.4.1 Fehlerbestimmung von benutzten Pipetten

In dieser Diplomarbeit wurden drei Pipetten (ein 100 µl von Pipetman und die anderen beide von Eppendorf 1000µl Pipette) benutzt. Die Fehler, die von diesen Pipetten stammen können, werden 20-mal mit bestimmter µl Hexanmenge ($d_{\text{Hexane}}=0,659 \text{ g/ml}$) gewogen und gerechnet.

Probe	100 µl Pipette	200-1000 µl Pipette	1000 µl Pipette
	Pipetman (M234880) (20 µl Hexan)	Eppendorf (29361) (180 µl Hexan)	Eppendorf (072677) (300 µl Hexan)
1	0,0119 g	0,1222 g	0,1921 g
2	0,0123 g	0,1157 g	0,1903 g
3	0,0123 g	0,1157 g	0,1906 g
4	0,0124 g	0,1198 g	0,1909 g
5	0,0130 g	0,1230 g	0,1910 g
6	0,0128 g	0,1200 g	0,1916 g
7	0,0124 g	0,1208 g	0,1928 g
8	0,0123 g	0,1241 g	0,1921 g
9	0,0124 g	0,1240 g	0,1927 g
10	0,0124 g	0,1265 g	0,1928 g
11	0,0125 g	0,1270 g	0,1923 g
12	0,0124 g	0,1225 g	0,1933 g
13	0,0120 g	0,1260 g	0,1916 g
14	0,0125 g	0,1241 g	0,1955 g
15	0,0123 g	0,1269 g	0,1950 g
16	0,0123 g	0,1251 g	0,1945 g
17	0,0125 g	0,1207 g	0,1913 g
18	0,0125 g	0,1227 g	0,1945 g
19	0,0123 g	0,1229 g	0,1928 g
20	0,0123 g	0,1208 g	0,1916 g
Mittelwert	0,0124	0,122525	0,191965
Standard-abweichung	0,000233959	0,000322456	0,000222474
Proz. Fehler	1,89%	0,26%	0,12%

Prozentuale Fehler = (Standard abw./Mittelwert)*100

Wie man aus der Tabelle ersehen kann, sind die Fehler, die von Pipetten herkommen, Prozentual sehr gering.

7.4.2 Fehler Bestimmung von Gaschromatographie

Für die Fehlerrechnung der Gaschromatographie werden 4 verschiedene (1,5 mol/L, 1mol/L 0,5 mol/L und 0,1 mol/L) Konzentrationen von D-IPG mit Hexan vorbereitet. Diese Probe wird mit Hexan 10-mal verdünnt. Der Grund der Verdünnung ist, kleinere Pickflecke zu bekommen, sonst werden sie sehr groß und laufen über dem Bildschirm über. Jede Probe wird 10-mal in der Gaschromatographie gemessen und berechnet.

Probe	1,5 mol/L	1 mol/L	0,5 mol/L	0,1 mol/L	1,5 (20 Fach verdünnt)
1	55513064	2793489	2307033	1496351	5012325
2	115243704	3056883	2354090	1402050	6170609
3	49346284	2866884	2414942	1467712	6676216
4	38829252	3051905	2558633	1564523	6720889
5	48838380	3384664	2440015	1544980	5881443
6	42656360	3354059	2868697	1605766	6578987
7	53671588	3410224	3113919	1652473	6807490
8	49696026	3773524	2706330	1660062	6747938
9	112881496	3939151	2711789	1756992	5660057
10	44810204	4260893	2866507	1798852	7409116
Mittelwert	61148635,8	3389167,6	2634195,5	1594976,1	6366507
Standard- abweichung	28322144,5	478839,488	264007,704	125628,892	691229,7222
Fehler	46,31	14,12	10,02	7,87	10,85

Prozentuale Fehler = (Standard abw./Mittelwert)*100

7.5 Einheiten der Enzymaktivität

Zwei Systeme zur Angabe von Enzymaktivitäten sind gängig:

1. die klassische, 1961 eingeführte "*enzyme unit*", definiert als diejenige Enzymmenge, die unter Standardbedingungen je min ein mol Substrat umsetzt. Reine Enzyme haben auf dieser Skala gut fassbare *spezifische Aktivitäten*, etwa zwischen 5 und 500 units/mg.
2. Die 1972 definierte **SI-Einheit** "*katal*" ("*kat*"), das ist die Enzymaktivität, ausgedrückt als mol umgesetztes Substrat je sec.

Die beiden Systeme sind folgendermaßen miteinander gekoppelt:

- $1 \text{ kat} = 6 \cdot 10^7 \text{ enzyme units}$
- $1 \text{ enzyme unit} = 16,67 \times 10^{-9} \text{ kat} = 16,67 \text{ nkat}$

Aktivität	Volumenaktivität	Spezifische Aktivität
$\mu\text{mol/min} = \text{unit}$	unit/ml	unit/mg
mol/s = katal	katal/ml	katal/mg oder katal/mol oder mol/(mol*s) (Wechselzahl)

Persönliche Daten

Geburtsdatum, -ort 14.01.1972, Arguvan / Türkei
Staatsangehörigkeit Deutsch – seit 1998 wohnhaft in Deutschland
Familienstand Ledig

10.2004 – 09.2010

Doktorarbeit in

Institut für Technische Chemie Hannover

Thema: Bestimmung von K_M und V_{max} -Werte durch die Methode der kleinsten Fehlerquadrate im Puls-System

10.2000 – 10.2004

Studium im Fach Chemie, Universität Hannover

Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie Hannover

- Schwerpunkt: Biotechnologie / Enzymkinetik
- Thema der Diplomarbeit:
Untersuchungen zur enantioselektiven, enzymatischen Synthese von IsoPropylidenglyserol in wässrigen und überkritischen Reaktionsmedium

10.1998 – 07.1999

Deutsch-Sprachkurs, DHS - Vorbereitungskurse, Hannover

04.1998 – 10.1998

Deutsch-Sprachkurs, Berlitz, Mittelstufe 2, Hannover

03.1997 – 12.1997

Deutsch-Sprachkurs, Inlingua, Mittelstufe 1, Türkei

08.1992 – 08.1996

Studium im Fach Chemieingenieur

Inönü Universität / Malatya / Türkei

- Diplomarbeit: *Herstellung und Industrielle Benutzung von Ölfarben*
- Studienschwerpunkt: *Chemische Ablaufprozesse und Herstellung von Zucker*

08.1991 – 07.1992

Vorbereitungs-Kurse für die Universität, Malatya / Türkei

08.1980 – 07.1991

Schulzeit, Malatya / Türkei, Abschluss: Abitur